

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Medicina**



**TESIS DOCTORAL**

**Marcadores séricos de inflamación bronquial en  
asma polínico estable**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Tomás Chivato Pérez**

Director:

**Rafael Laguna Martínez**

**Madrid, 2002**

ISBN: 978-84-8466-547-2

© Tomás Chivato Pérez, 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MARCADORES SERICOS DE INFLAMACION BRONQUIAL  
EN ASMA POLINICO ESTABLE

TESIS DOCTORAL

TOMAS CHIVATO PEREZ

MADRID MAYO DE 1994

**TOMAS CHIVATO PEREZ**

**MARCADORES SERICOS DE INFLAMACION BRONQUIAL  
EN ASMA POLINICO ESTABLE**

Investigación realizada en el Servicio de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario del Aire, bajo la dirección del Dr. D. Rafael Laguna Martínez y tutoría del Prof. Dr. D. Francisco Javier Gómez de Terreros Sánchez, presentada para optar al grado de Doctor en Medicina Interna en el Departamento de Medicina, Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

A Angeles, por su comprensión,  
apoyo y paciencia.

A Tomás y Leticia, para que sepan  
perdonarme.

A mis padres y hermanos.

## AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Rafael Laguna Martínez, por su apoyo constante durante los años de realización de este proyecto, por sus acertados consejos, por las correcciones del manuscrito, y por su preocupación diaria por cumplir la triple función de un médico: asistencial, docente e investigadora.

- Al Prof. Dr. Francisco Javier Gómez de Terreros, por su admirable e incansable actividad docente pre y postgrado, creador de los "tribunales críticos" del Hospital Universitario del Aire (H.U.A.), de los que este trabajo se ha visto beneficiado por las críticas siempre constructivas emitidas por sus componentes.

- Al Dr. David Martínez, jefe del Servicio de Medicina Preventiva y Estadística del H.U.A., por su ayuda, colaboración, críticas y consejos efectuados en el tratamiento estadístico de los resultados.

- Al Dr. Rafael Blasco y a D<sup>a</sup> Magdalena Melgarejo, del Servicio de Medicina Nuclear del H.U.A., por su colaboración en las determinaciones radioisotópicas realizadas en este trabajo.

- A D<sup>a</sup> Pilar Vargas, ATS del laboratorio de pruebas funcionales del Servicio de Neumología del H.U.A., por su inestimable colaboración en la realización de las pruebas de función respiratoria.

- A los técnicos del laboratorio del Servicio de Inmunología y Alergia del H.U.A., D<sup>a</sup> Eulalia Fernández, D<sup>a</sup> Concepción Herreras, D<sup>a</sup> Magdalena Raya y D. Andrés Espinosa, con los que he compartido el trabajo diario en el laboratorio en los últimos tres años, por su esfuerzo y dedicación.

- A todos los miembros, plantilla y residentes, de la Sección de Alergia del Hospital General "Gregorio Marañón" de Madrid, dirigidos de forma admirable por la Dra. Rubio Sotés, con los que realicé mi formación como alergólogo durante el periodo 1987-1991, por su generosidad, amistad y espíritu investigador.

- Al Hospital Universitario del Aire, centro en el que cursé los estudios de licenciatura de Medicina durante el periodo 1980-1983, en donde recibí una formación humana y técnica difícilmente cuantificable, por mantener un ambiente propicio a la investigación, además de alcanzar unos niveles docentes y asistenciales elogiabiles.

- Al Servicio de Aparato Digestivo del H.U.A., donde permanecí como alumno interno durante los cursos 1981-82 y 1982-83, especialmente al Dr. Francisco Javier Pérez-Piqueras que fue la persona que me introdujo en el método científico.

- A los pacientes, los que han colaborado en este trabajo y los que estudiamos y tratamos a diario, fin último de nuestra actividad como médicos.

- A los estudiantes de Medicina internos del Servicio de Inmunología y Alergia durante los cursos académicos 1991-92, 1992-93 y 1993-94, por el estímulo diario que supone su interés por aprender.

- A D<sup>a</sup> Guadalupe Pastor y al Dr. Ricardo Ferrando por su colaboración en el aporte de bibliografía.



## **ABREVIATURAS**

Ac	Anticuerpo
AcMo	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
AH	Acido hialurónico
CAP	Sistema de ensayo inmunológico caracterizado porque la fase sólida es un polímero hidrofílico encerrado en una cápsula
Ci	Curio
CPT	Capacidad pulmonar total
CRF	Capacidad reserva funcional
EDN	Neurotoxina del eosinófilo
EPO	Peroxidasa del eosinófilo
FEC-MG	Factor estimulante de crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos
FEM	Flujo espiratorio máximo
FEV1	Volumen espiratorio forzado en el primer segundo
FQE	Factor quimiotáctico de los eosinófilos
FQN	Factor quimiotáctico de los neutrófilos
FVC	Capacidad vital forzada
GIF	Factor inhibidor de glicosilación
HB	Hiperreactividad bronquial
HBI	Hiperreactividad bronquial inespecífica
HETE	Acido hidroxieicosatetranoico
IFN	Interferón
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina

KU	Kilounidades
LBA	Lavado broncoalveolar
LT	Leucotrieno
MPO	Mieloperoxidasa
NK	Natural killer (célula citotóxica natural)
PAF	Factor activador plaquetario
PBM	Proteína básica mayor
PCE	Proteína catiónica del eosinófilo
PD20	Concentración de metacolina que produce un descenso de FEV1 igual o superior al 20%
PEF	Pico espiratorio flujo
PG	Prostaglandina
PXE	Proteína X del eosinófilo
RIA	Radioinmunoanálisis
TRP	Triptasa
TX	Tromboxano
UA	Unidades acumuladas
UI	Unidades inhaladas

## INDICE

	Pág.
<b>1. INTRODUCCION . . . . .</b>	<b>1</b>
1.1. Concepto de asma bronquial . . . . .	2
1.2. Clasificación del asma bronquial . . . . .	4
1.3. Eosinófilos y asma . . . . .	7
1.3.1. Eosinófilos en sangre periférica . . . . .	9
1.3.2. Eosinófilos en esputo y lavado broncoalveolar . . . . .	10
1.3.3. Eosinófilos en tejidos . . . . .	11
1.3.4. Mediadores de los eosinófilos . . . . .	12
1.3.5. Mediadores lipídicos . . . . .	15
1.4. Mastocitos y asma . . . . .	15
1.4.1. Triptasa . . . . .	16
1.4.2. Histamina . . . . .	18
1.4.3. Otros mediadores . . . . .	19
1.5. Monocitos y macrófagos . . . . .	19
1.6. Plaquetas . . . . .	19
1.7. Otras células implicadas . . . . .	20
1.7.1. Linfocitos . . . . .	20
1.7.2. Neutrófilos . . . . .	21
1.7.3. Fibroblastos. . . . .	21
1.7.4. Células epiteliales . . . . .	22
1.8. Hiperreactividad bronquial . . . . .	23
1.8.1. Concepto . . . . .	23
1.8.2. Clasificación . . . . .	23
1.8.3. Mecanismos implicados . . . . .	23

	Pág.
1.8.4. Métodos de evaluación . . . . .	24
1.8.4.1. Tests de provocación bronquial	
específica . . . . .	24
1.8.4.1.1. Tests con alérgenos inhalados . . .	24
1.8.4.1.2. Tests con inhalantes ocupacionales	25
1.8.4.1.3. Tests con fármacos orales . . . . .	25
1.8.4.2. Tests de provocación bronquial	
inespecífica . . . . .	26
1.8.4.2.1. Tests con fármacos inhalados . . .	26
1.8.4.2.2. Tests con fármacos orales . . . . .	26
1.8.4.2.3. Tests con métodos físicos . . . . .	26
 2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS . . . . .	 27
 3. MATERIAL Y METODOS . . . . .	 29
3.1. Población estudiada . . . . .	30
3.1.1. Criterios de inclusión y exclusión. . . .	30
3.1.2. Grupos diagnósticos . . . . .	31
3.1.3. Tabaquismo . . . . .	33
3.1.4. Edad . . . . .	33
3.1.5. Sexo . . . . .	33
3.2. Pruebas diagnósticas "in vivo" . . . . .	34
3.2.1. Pruebas cutáneas . . . . .	34
3.2.2. Prueba de hiperreactividad bronquial	
inespecífica . . . . .	35

	Pág.
3.2.2.1. Equipo técnico . . . . .	36
3.2.2.2. Metodología del test . . . . .	36
3.3. Pruebas diagnósticas "in vitro" . . . . .	40
3.3.1. Recogida de muestras . . . . .	40
3.3.2. Recuento de eosinófilos . . . . .	40
3.3.3. Determinación de Ig E total . . . . .	41
3.3.4. Determinación de Ig E específica . . . . .	44
3.3.5. Determinación de marcadores de activación proinflamatorios . . . . .	46
3.3.5.1. Proteína catiónica del eosinófilo (PCE) . . . . .	46
3.3.5.2. Proteína X del eosinófilo (PXE) . . . . .	50
3.3.5.3. Mieloperoxidasa (MPO) . . . . .	53
3.3.5.4. Acido hialurónico (AH) . . . . .	56
3.3.5.5. Triptasa . . . . .	58
3.4. Metodología estadística . . . . .	59
3.4.1. Soporte informático . . . . .	59
3.4.2. Estimación de la normalidad . . . . .	60
3.4.3. Estadística descriptiva . . . . .	60
3.4.4. Estadística analítica . . . . .	60
3.4.5. Estudio de correlación . . . . .	61
3.4.6. Nivel de significación . . . . .	61
3.4.7. Evaluación de la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba . . . . .	61
3.5. Búsqueda bibliográfica . . . . .	62

	Pág.
<b>4. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>63</b>
4.1. Distribución de frecuencias	
por diagnósticos . . . . .	74
4.2. Tabaquismo . . . . .	74
4.3. Ig E específica . . . . .	74
4.4. Ajuste a la normal . . . . .	76
4.5. Pruebas diagnósticas "in vivo" . . . . .	76
4.5.1. Pruebas cutáneas . . . . .	76
4.5.2. Test de hiperreactividad bronquial	
(HB) inespecífica . . . . .	77
4.6. Pruebas diagnósticas "in vitro" . . . . .	79
4.6.1. Recuento de eosinófilos . . . . .	79
4.6.2. Ig E total . . . . .	82
4.6.3. Ig E específica . . . . .	84
4.6.4. Proteína catiónica del eosinófilo . . . . .	86
4.6.5. Proteína X del eosinófilo . . . . .	88
4.6.6. Mieloperoxidasa . . . . .	90
4.6.7. Acido hialurónico . . . . .	92
4.6.8. Triptasa . . . . .	94
4.7. Estudio de la sensibilidad y especificidad, valor	
predictivo positivo y valor predictivo negativo	
de la prueba . . . . .	94
4.8. Estudio de correlación . . . . .	102
4.8.1. PCE y recuento de eosinófilos . . . . .	102
4.8.2. PCE e Ig E total y específica . . . . .	102



	Pág.
4.8.3. PCE y test de HB . . . . .	102
4.8.4. PXE y recuento de eosinófilos . . . . .	102
4.8.5. PXE e Ig E total y específica . . . . .	102
4.8.6. PXE y test de HB . . . . .	103
4.8.7. MPO y test de HB . . . . .	103
4.8.8. AH y test de HB . . . . .	103
4.8.9. PCE y PXE . . . . .	103
4.8.10. Edad y marcadores . . . . .	103
4.8.11. Años de evolución . . . . .	104
 <b>5. DISCUSION. . . . .</b>	 <b>105</b>
5.1. Pruebas cutáneas, Ig E total e IgE específica. .	106
5.2. Recuento de eosinófilos. . . . .	108
5.3. PCE y PXE. . . . .	109
5.4. Triptasa. . . . .	116
5.5. Mieloperoxidasa. . . . .	118
5.6. Acido hialurónico. . . . .	121
5.7. Test de hiperreactividad bronquial. . . . .	122
5.8. Correlación marcadores séricos de inflamación e hiperreactividad bronquial . . . . .	124
5.9. Niveles críticos de decisión obtenidos. . . . .	125
 <b>6. CONCLUSIONES . . . . .</b>	 <b>128</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA . . . . .</b>	<b>132</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

	Pág.
Tabla I. Neumopatías que cursan con eosinofilia . .	7
Tabla II. Otras enfermedades no pulmonares que cursan con eosinofilia . . . . .	8
Tabla III. Propiedades de las proteasas mastocitarias . . . . .	18
Tabla IV. Dosis acumulada de metacolina . . . . .	39
Tabla V. Niveles de Ig E específica agrupados en clases . . . . .	46
Tabla VI. Número de casos por grupos diagnósticos . . . . .	74
Tabla VII. Número de fumadores por grupos diagnósticos . . . . .	74
Tabla VIII. Distribución de frecuencias según el grado de positividad de Ig E específica. . . . .	75
Tabla IX. Ig E específica por grupos diagnósticos . . . . .	75
Tabla X. Resultados del test de HB por grupos diagnósticos . . . . .	77
Tabla XI. PD20 en los distintos grupos diagnósticos . . . . .	78
Tabla XII. Recuento de eosinófilos por grupos diagnósticos . . . . .	80

	Pág.
Tabla XIII. Eosinófilos en función de la severidad de HB . . . . .	81
Tabla XIV. Ig E total por grupos diagnósticos . . .	82
Tabla XV. Ig E total en función del grado de HB . . . . .	83
Tabla XVI. Ig E específica por grupos diagnósticos . . . . .	84
Tabla XVII. Ig E específica en función del grado de HB . . . . .	85
Tabla XVIII. PCE por grupos diagnósticos . . . . .	86
Tabla XIX. PCE en función del grado de HB . . . . .	87
Tabla XX. PXE por grupos diagnósticos . . . . .	88
Tabla XXI. PXE en función del grado de HB . . . . .	89
Tabla XXII. MPO por grupos diagnósticos . . . . .	90
Tabla XXIII. MPO en función del grado de HB . . . . .	91
Tabla XXIV. AH por grupos diagnósticos . . . . .	92
Tabla XXV. AH en función del grado de HB . . . . .	93

## FIGURAS

Figura 1. Curva Característica Operador Receptor de la PCE (metacolina positiva versus negativa) .	95
Figura 2. Curva Característica Operador Receptor de la PXE (metacolina positiva versus negativa) .	97

Figura 3. Curva Característica Operador Receptor de la  
MPO (metacolina positiva versus negativa) . 99

Figura 4. Curva Característica Operador Receptor del AH  
(metacolina positiva versus negativa) . . . 101

## **1. INTRODUCCION**

### 1.1. CONCEPTO DE ASMA BRONQUIAL.

El asma bronquial es una enfermedad conocida desde los tiempos de Hipócrates (1). Sin embargo a pesar del tiempo transcurrido no se ha conseguido encontrar una definición satisfactoria.

En 1987 el Comité de estandarización diagnóstica de la American Thoracic Society la definió como "obstrucción episódica reversible de las vías aéreas, bien de forma espontánea o bien con fármacos"(2).

Desde hace tiempo se conocen datos que revelan la importancia del componente inflamatorio en el asma. En la anatomía patológica de los estudios postmortem se describe rotura epitelial, hiperplasia caliciforme, tapones mucosos, engrosamiento de la membrana basal, infiltración eosinofílica, mastocitos degranulados, etc. (3). En los últimos años gracias a la realización de fibrobroncoscopias con lavado broncoalveolar y biopsia bronquial, se han obtenido datos concordantes con la existencia de inflamación bronquial (4).

Recientemente el concepto de asma ha ido evolucionando y se ha subrayado el componente inflamatorio y el papel de los eosinófilos como causa y mantenimiento de la inflamación. Barnes propuso en 1989 el término de

"bronquitis eosinofílica descamativa crónica" para describir esta enfermedad (5).

En la actualidad se acepta la definición realizada por el Consenso Internacional sobre diagnóstico y tratamiento del asma: "El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas con participación de numerosas células, mastocitos y eosinófilos incluídos. En los individuos susceptibles esta inflamación es la causa de la obstrucción de la vía aérea, reversible espontáneamente o con tratamiento, y del incremento de la respuesta de la misma a estímulos muy diversos" (6). En esta definición se engloban los hallazgos previos de obstrucción, hiperreactividad e inflamación bronquial.

Se ha demostrado la importancia de diversas células proinflamatorias y de los mediadores químicos por ellas liberados que se pueden determinar tanto en diferentes fluidos biológicos (suero, lavado broncoalveolar o exudado nasal), como en los propios tejidos (7,8,9,10). Estas células y sus mediadores son copartícipes en la genesis y mantenimiento de la hiperreactividad bronquial y por tanto de la respuesta exagerada a diferentes estímulos, inócuos para el resto de las personas, como son los neumoalergenos o el ejercicio físico, por ejemplo (11,12).



## **1.2. CLASIFICACION DEL ASMA BRONQUIAL.**

En la actualidad se distinguen dos tipos de asma bronquial en función del mecanismo etiológico: alérgico y no alérgico (13).

El asma bronquial alérgico, también denominado asma extrínseco, se debe a la inhalación de determinados alergenosen sujetos susceptibles genéticamente. Los alergenosen aéreos más frecuentemente implicados son los pólenes de gramíneas, árboles y malezas, los ácaros del polvo doméstico, los epitelios de animales y las esporas de hongos (14).

El mecanismo íntimo está basado en la reacción de hipersensibilidad tipo I de la clasificación de Gell y Coombs (15) (1965). Se trata de una respuesta inmunológica exagerada inducida por interacciones celulares que conllevan la liberación de determinados mediadores que producen lesiones tisulares. Esta reacción de hipersensibilidad está mediada por la Ig E, que es un anticuerpo homocitotrópico capaz de unirse por su fragmento Fc a células que tienen receptores de alta afinidad (RFCEI), como son los mastocitos y basófilos, o receptores de baja afinidad (RFCEII) como son los macrófagos, eosinófilos y plaquetas.

La regulación de la síntesis de Ig E depende de varios factores (16). En primer lugar la interleucina-4 (IL-4) amplifica la síntesis de Ig E por las células plasmáticas mientras que el interferón gamma (IFN-G) la disminuye. La respuesta Ig E está condicionada genéticamente pues depende de los linfocitos T supresores que mediante la acción del factor de inhibición de la glicosilación (GIF) suprimen su síntesis.

Una vez que se produce la síntesis de Ig E específica frente a un determinado aeroalergeno, ésta queda fijada a la membrana de las células citadas previamente. En posteriores contactos se produce la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) dando lugar a la unión de 2 moléculas de Ig E por cada molécula de Ag (17). Se produce entonces un cambio conformacional de la membrana mastocitaria permitiendo la salida de mediadores preformados como son la histamina o el factor quimiotáctico de los eosinófilos (FQE). Posteriormente se sintetizan nuevos mediadores por activación de la fosfolipasa A2 de la membrana lipídica y se originan, a partir del ácido araquidónico vía lipoxigenasa, los leucotrienos y tromboxanos y vía cicloxigenasa las prostaglandinas (PG). De esta manera acuden al foco células entre las que se encuentran los eosinófilos, y se producen acciones sobre las fibras musculares lisas y la permeabilidad vascular. Estos mediadores y sus acciones son los responsables de la aparición de la tos, disnea, sibilancias y del resto de la

sintomatología que refieren los pacientes asmáticos.

La reacción alérgica tiene dos fases diferenciadas. Una fase temprana que ocurre pocos minutos después de la exposición al alérgeno y depende de los mediadores mastocitarios y una fase tardía que ocurre 4 ó 6 horas después de la exposición al alérgeno y depende de los eosinófilos y macrófagos (18).

El diagnóstico del asma bronquial extrínseco se realiza por historia clínica, realización de pruebas cutáneas y determinación de Ig E total y específica (19).

Con frecuencia el asma extrínseco se asocia con la rinitis alérgica (20). Esta enfermedad también se caracteriza por la inflamación de la mucosa nasal, acompañada de hiperreactividad nasal que es la responsable de la aparición de los síntomas característicos como son rinorrea, estornudos, prurito y la obstrucción nasales. La rinitis alérgica es más frecuente que el asma y pueden darse aisladas o asociadas. Los mecanismos, regulación, células implicadas y sus mediadores son los mismos.

El asma bronquial no alérgico no posee un mecanismo inmunológico conocido tan evidente como el referido para el asma extrínseco. Fundamentalmente incluye el asma intrínseco (21). Se diferencia básicamente del asma alérgico en la ausencia de historia clínica estacional,

pruebas cutáneas negativas, Ig E total normal e Ig E específica negativa. Las células implicadas y sus mediadores sí son superponibles. La sintomatología es similar, aunque es más frecuente en mujeres mayores de 40 años, se asocia a intolerancia con antiinflamatorios no esteroideos y suele ser corticodependiente.

### 1.3. EOSINOFILOS Y ASMA.

Se conoce desde hace varias décadas la existencia del aumento del número de eosinófilos y de sus productos en sangre periférica y esputo de pacientes diagnosticados de asma (22). El eosinófilo es la célula que diferencia el asma bronquial de otros procesos inflamatorios de las vías aéreas (23).

El aumento de cifras de eosinófilos ocurre tanto en pacientes con asma bronquial extrínseco como en casos de asma intrínseco. Es importante resaltar la existencia de otras neumopatías que cursan con eosinofilia (24) (TABLA I):

Síndrome de Löfller
Neumonía eosinofílica
Neumonía eosinofílica crónica
Aspergilosis broncopulmonar
Granulomatosis broncocéntrica
Eosinofilia pulmonar
Vasculitis pulmonar
Granulomatosis alérgica (Síndrome de Churg-Strauss)

TABLA I: neumopatías que cursan con eosinofilia

Además se observa eosinofilia en sangre periférica en otras enfermedades no pulmonares (25) (TABLA II):

<b>Aparato digestivo</b>	<b>Enf. cutáneas</b>
-Gastroenteritis eosinófila	-Pénfigo
-Granuloma eosinófilo digestivo	-Psoriasis
-Intolerancia leche vaca	-Mastocitosis
-Enteropatía inflamatoria	-Eritema multiforme
-Colangitis esclerosante	-Eritema infeccioso
-Hepatitis viral aguda	<b>Enf. hematológicas</b>
-Hepatitis crónica activa	-Anemia perniciosa
<b>Infecciones</b>	-Deficit ácido fólico
-Paludismo	-Leucemia linfocítica
-Tuberculosis	-Leucemia mielocítica
-Toxoplasmosis	-Mieloma múltiple
-Infecciones parasitarias	-Policitemia vera
<b>Conectivopatías</b>	-Macroglobulinemia
-Poliarteritis nodosa	-Enfermedad de cadenas pesadas
-Artritis reumatoide	-Mielofibrosis
-Esclerosis sistémica	<b>Enf. oncológicas</b>
-Síndrome de Sjögren	-Sarcoma de células reticulares
-Dermatomiositis	-Linfosarcoma
-Granulomatosis Wegener	-Tumores sólidos malignos (ovario, pulmón, etc)
	-Enfermedad de Hodgkin
<b>Patología endocrinológica</b>	
-Panhipopituitarismo	
-Insuficiencia adrenal	
-Parálisis hipokaliémica	

TABLA II: Otras enfermedades no pulmonares en las que se observa eosinofilia

Se ha descrito la correlación existente entre el grado de hiperreactividad bronquial y el número de eosinófilos y sus productos (26). Tras la inhalación de alérgeno se

observa un aumento del número de eosinófilos en el lavado broncoalveolar (LBA) y existe una estrecha correlación entre el incremento observado y el grado de hiperreactividad bronquial (27).

#### **1.3.1. Eosinófilos en sangre periférica.**

En el asma bronquial es característica la participación de la célula cebada o mastocito, que libera, entre otros mediadores, el factor quimiotáctico de los eosinófilos (FQE-A)(28). Además, parece ser que los linfocitos que infiltran la mucosa bronquial de los pacientes con asma liberan interleucinas 3 y 5, así como factor estimulante de crecimiento de los granulocitos y monocitos (FEC-GM) que son capaces de incrementar la formación de eosinófilos en médula ósea y de aumentar su actividad y supervivencia (29).

La determinación de eosinófilos en sangre periférica tiene un valor relativo dado que el número total de eosinófilos existente en la médula ósea y en los tejidos es varias veces el de la sangre, alcanzando valores incluso 100 veces superiores. En el asma bronquial la sangre es únicamente un medio de transporte de los eosinófilos desde su órgano de producción hasta su lugar de acción (30).

Los eosinófilos en sangre no suelen pasar del 4%. En este sentido habría que precisar que muchos eosinófilos

pueden pasar desapercibidos si los contadores celulares empleados para realizar los hemogramas de forma automática no están especialmente diseñados para identificar estas células. En algunos de ellos los eosinófilos se incluyen dentro de los monocitos. Por lo tanto es conveniente realizar el cómputo celular en cámaras de recuento para obtener valores absolutos fiables (31).

Existen diferentes trabajos que asignan valores normales de 125 eosinófilos/ $\mu$ l en adultos y 225 eosinófilos/ $\mu$ l en niños menores de doce años; los límites inferior y superior pueden variar entre 35 y 50 y entre 300 y 350 eosinófilos/ $\mu$ l respectivamente (25).

Es importante resaltar que diferentes circunstancias como el ejercicio físico, estrés emocional, fármacos  $\beta$ -adrenérgicos, ciclos hormonales e incluso variaciones horarias pueden influir en los niveles sanguíneos de los eosinófilos (30).

#### **1.3.2. Eosinófilos en esputo y lavado broncoalveolar.**

Existen diferentes trabajos que demuestran la existencia de eosinófilos en esputo (32) y lavado broncoalveolar (33) en relación con el grado de severidad del asma bronquial. La determinación de los eosinófilos en estos fluidos es más sensible que el estudio en sangre periférica (34).

En el estudio de eosinófilos en esputo es importante recoger una muestra representativa para realizar una correcta valoración de estas células (35). La presencia de eosinófilos en esputo en porcentaje igual o superior al 20% es característica de asma bronquial (36).

La realización de una fibrobroncoscopia y de LBA permite identificar las diferentes poblaciones celulares y objetivar los eosinófilos. En el LBA normal no suelen encontrarse eosinófilos o son inferiores al 1%. Cifras superiores se encuentran en pacientes con asma (37,38).

El estudio de eosinófilos en esputo y lavado requiere una metodología precisa en la recogida y procesamiento de la muestra para obtener datos valorables (39).

En la citología de esputo se pueden observar productos derivados de los eosinófilos como son los cristales de Charcot-Leyden (30).

### **1.3.3. Eosinófilos en tejidos.**

Los hallazgos anatomopatológicos dependen del grado de severidad del asma, del tiempo de evolución, y de la fase pues son diferentes durante un ataque que en el periodo estable o intercrítico (40). Es importante resaltar que incluso en los estudios realizados en asmáticos en fase



estable es posible encontrar datos sugestivos de inflamación bronquial (41). En la actualidad se dispone de diversas técnicas de microscopía electrónica que permiten realizar recuentos de eosinófilos (42). Es posible detectarlos en el epitelio, en la lámina propia y en los vasos sanguíneos. Durante un ataque de asma el número de eosinófilos está aumentado 100 veces respecto a fases estables.

En la actualidad se dispone de métodos basados en inmunohistoquímica que permiten objetivar el aumento del número de eosinófilos y su activación en la mucosa bronquial. La detección de la proteína catiónica del eosinófilo (PCE) fuera del eosinófilo con el anticuerpo monoclonal EG2, que reacciona específicamente con ella, nos indica la liberación del mediador químico y por tanto la activación celular (43).

#### **1.3.4. Mediadores de los eosinófilos.**

Existen unos mediadores preformados almacenados en el interior de los gránulos intracitoplasmáticos del eosinófilo. Los cuatro componentes básicos preformados son la proteína catiónica del eosinófilo (PCE), la proteína X del eosinófilo o neurotoxina del eosinófilo (PXE/EDN), la peroxidasa del eosinófilo (EPO) y la proteína básica mayor (PBM) (44).

La PCE es una proteína citotóxica con actividad ribonucleasa. Posee un peso molecular de 21.000 y es rica en arginina. Se diferencia desde el punto de vista de la inmunohistoquímica de la PBM. Entre sus funciones destaca la alteración que produce en los glicosaminos de los fibroblastos y la estimulación de la secreción de moco en la vía aérea. Además inhibe la proliferación de linfocitos T e influye en la fibrinolisis mediante la preactivación del plasminógeno (45). Entre sus acciones "in vitro" están la destrucción de parásitos, ciertas propiedades antibacterianas y la inhibición de los efectos de la heparina (46). Puede detectarse en suero (47), secreción nasal (48), esputo (49), LBA (50) e incluso en orina (51). Parece estar implicada en la respuesta de fase tardía e indica la activación del eosinófilo (52).

La PXE/EDN tiene igualmente actividad ribonucleasa, aunque 100 veces superior a la PCE. Posee propiedades citotóxicas como lo demuestran las lesiones que produce "in vitro" en el tejido cerebral de animales de experimentación. Como la PCE, también inhibe la proliferación de linfocitos T (53).

La EPO es una peroxidasa con una potente acción citotóxica. Entre sus principales funciones están la inactivación de los mediadores lipídicos y la capacidad de inducir degranulación mastocitaria. Además, puede favorecer la agregación plaquetaria y aumentar la adhesividad de los

neutrófilos (54).

La PBM es también citotóxica. Entre sus acciones destacan la degranulación de mastocitos y basófilos y la inducción de agregación plaquetaria. Además induce la producción de aniones superóxido por los neutrófilos, produce contracción del músculo liso bronquial e inhibe la producción de moco (55).

PCE, PXE y EPO son específicas del eosinófilo, mientras que la PBM aparece también en los basófilos. PCE, PXE, EPO y PBM representan el 90% de todas las proteínas granulares del eosinófilo (56).

Los efectos citados de estos mediadores lesionan el epitelio respiratorio y son los responsables de la denudación epitelial que favorece el desarrollo de hiperreactividad bronquial de la vía aérea de los pacientes con asma (57).

En la actualidad se dispone de técnicas basadas en radioinmunoanálisis (58) que permiten cuantificar estos mediadores en distintos fluidos biológicos como son el suero, esputo y LBA. Se ha demostrado una buena correlación entre los distintos fluidos de las determinaciones realizadas de los marcadores de activación del eosinófilo (59,60,61).

#### **1.3.5. Mediadores lipídicos.**

El eosinófilo también produce mediadores derivados del metabolismo del ácido araquidónico. Entre estos mediadores destacan la prostaglandina E2 (PGE2), el leucotrieno C4 (LTC4) y el factor activador plaquetario (PAF). El PAF juega un importante papel en la inducción de la secreción de los mediadores contenidos en los gránulos intracitoplasmáticos de los eosinófilos (62). Además el PAF produce vasoconstricción, aumenta la permeabilidad vascular, funciona como agente quimiotáctico de los eosinófilos, e incrementa la secreción de moco y la hiperreactividad bronquial (63).

#### **1.4. MASTOCITOS Y ASMA.**

En 1879 Paul Ehrlich identificó los mastocitos en tejido conjuntivo en función de las propiedades de tinción de sus gránulos citoplasmáticos (64).

Están situados en posición adyacente a los vasos sanguíneos y linfáticos e inmediatamente por debajo de las superficies epiteliales como son las del aparato respiratorio, gastrointestinal y la piel (65).

Los mastocitos maduros humanos son células de 9-12  $\mu$ . El núcleo varía en su forma de redondeado a oval, no está

segmentado y generalmente ocupa una posición excéntrica. Posee gránulos numerosos, pequeños y de formas variables. El contenido de los gránulos es heterogéneo y puede tener el aspecto de laminillas enrolladas, partículas o cristales, aislados o combinados (66).

Producen liberación de histamina, que puede medirse en orina en forma de N-metilhistamina, y triptasa (67).

Los mastocitos son los responsables de la reacción en fase temprana (68). Juegan un importante papel tanto en el asma de causa inmunológica como en situaciones no inmunológicas como pueden ser el ejercicio, el frío o la hiperventilación (69,70).

#### **1.4.1. Triptasa.**

La triptasa ha sido la primera proteasa neutra claramente identificada en los mastocitos humanos, donde constituye alrededor del 23% del total de proteínas. Predomina en mastocitos pulmonares, cutáneos y del aparato gastrointestinal (71). Se identificó en primer lugar en la piel humana. Su liberación por los mastocitos se puede cuantificar mediante espectrofotometría utilizando tosil-l arginina metil éster (TAME) como sustrato (72).

Contiene serina e histidina en su zona activa, pero a diferencia de la tripsina, la triptasa (TRP) no es inhibida

por acción de la alfa-1 antitripsina, la aprotinina o los inhibidores de la tripsina aislados en semilla de lima, soja y ovomucoide (73).

La TRP está formada por un tetramero con un peso molecular de 144.000 D que consta de dos subunidades de 37.000 D y dos de 35.000 D. Posee una actividad serinesterasa muy variada sobre sustratos proteicos. Se ha demostrado que descompone selectivamente la molécula de complemento C3 en sus péptidos constituyentes C3a y C3b (74).

En la actualidad puede determinarse mediante RIA en diferentes fluidos como son suero (75), esputo, exudado nasal (76) y LBA (77).

La triptasa puede ser utilizada como marcador de reacciones en las que están involucrados los mastocitos. Junto con la quimasa puede considerarse como un marcador específico mastocitario. En la siguiente tabla se comparan las propiedades de las distintas proteasas mastocitarias:

Propiedades	Triptasa	Quimasa	Carboxipeptidasa
Tamaño(daltons)	134.000	34.000	34.000
Estructura	tetrámero	monómero	monómero
pH óptimo	neutro	neutro	neutro
Especificidad sustrato	lys, arg (interna)	phe, tyr (interna)	leu, ala (c-terminal)
Heparina	fija, estabiliza	fija	
Regulación	disociación a monómero inactivo	inhibida proteasas plasma/tej	
Picogramos/cél.			
TC (piel)	35	4.5	15-25
T (pulmón)	10	< 0.5	2

TABLA III: Propiedades de las proteasas mastocitarias.

#### 1.4.2. Histamina.

Es la responsable de los cambios ocurridos en la respuesta temprana de la reacción de hipersensibilidad. Aparece aumentada su concentración tanto en suero (78) como en LBA (79). La N-metilhistamina es un metabolito urinario que aparece en las horas siguientes a la liberación de histamina (80).

#### **1.4.3. Otros mediadores.**

Los mastocitos liberan además LTC<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub>, PAF, péptidos quimiotácticos, enzimas proteolíticos y proteoglicanos que favorecen la broncoconstricción (81,82,83).

#### **1.5. MONOCITOS Y MACROFAGOS.**

Son las células que aparecen en mayor número en el LBA de sujetos asmáticos y normales (84,85). Los monocitos y macrófagos tienen receptores para Ig E. Producen un amplio rango de eicosanoides, incluido el PAF, y participan en la respuesta de la vía aérea a la inhalación de alergenos. Los macrófagos son peroxidasa positivos y aumentan en LBA tras la provocación con alergeno por migración de los monocitos al pulmón (86).

#### **1.6. PLAQUETAS.**

En trabajos de experimentación con animales se ha demostrado que la deplección de plaquetas evita la hiperreactividad bronquial inducida por PAF (87). En pacientes atópicos se han obtenido plaquetas en LBA y se ha identificado el factor plaquetario 4 en plasma (88).



En la actualidad no se les atribuye un papel fundamental en la genesis de la hiperreactividad bronquial. Posiblemente la extravasación microvascular asociada al depósito de fibrina y el atrapamiento de plaquetas induciría la actividad de los componentes de la coagulación (89).

#### **1.7. OTRAS CELULAS IMPLICADAS: LINFOCITOS, NEUTROFILOS, FIBROBLASTOS Y CELULAS EPITELIALES.**

##### **1.7.1. Linfocitos.**

Los linfocitos producen una serie de linfocinas: Interleucina-4 (IL4), Interleucina-5 (IL5) e Interferón gamma (IFNG) que regulan la síntesis de Ig E (90). Por otro lado la Interleucina-3 (IL3), IL5 y el factor estimulante de crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos (FEC-MG) controlan la producción de eosinófilos.

En el asma se objetiva un aumento de las células natural killer (NK). En pacientes asmáticos refractarios a tratamiento corticosteroideo existe un descenso de la población T supresora (CD8) y por el contrario se describe un aumento de la población CD8 en sujetos que responden a la inmunoterapia específica (91).

### **1.7.2. Neutrófilos.**

Los neutrófilos no son células que jueguen un papel importante en la patogenia del asma. Se ha demostrado un aumento de la mieloperoxidasa (MPO) en el LBA de asmáticos y se ha interpretado como responsable en cierta forma del asma en fases precoces (92). También se ha objetivado en LBA actividad quimiotáctica neutrofílica de elevado peso molecular (93).

Los neutrófilos producen PG, tromboxanos (TX), leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) y PAF, que pueden lesionar la vía respiratoria y favorecer la aparición de hiperreactividad bronquial (94).

### **1.7.3. Fibroblastos.**

La presencia de bandas hialinas en el epitelio de las vías aéreas de los asmáticos fue uno de los primeros hallazgos postmortem (95). Cutz y colaboradores estudiaron ultraestructuralmente esta banda y comprobaron que se trataba de bandas de colágeno, tipos I, III y V, que procedían de fibroblastos (96). En la actualidad se utiliza el término de miofibroblasto que engloba las características ultraestructurales del músculo liso, contráctil, y del fibroblasto, con capacidad de síntesis (97). Con el empleo del AcMo PR2D3 es posible detectar

estas células (98).

El ácido hialurónico es sintetizado por los fibroblastos. Se ha encontrado en LBA aumento de sus niveles en sujetos asmáticos (33).

#### **1.7.4. Células epiteliales.**

En el asma bronquial existe alteración epitelial objetivada en los hallazgos anatomopatológicos realizados en biopsia bronquial mediante fibrobroncoscopía y en los estudios postmortem (3). En los ataques agudos se observan cuerpos de Creola y espirales de Curschman. En los exámenes postmortem hay descamación extensa y también inflamación epitelial. Incluso en el asma estabilizado hay indicios de descamación del epitelio de la vía respiratoria (99).

Las células epiteliales juegan un importante papel en la defensa de la vía aérea. Son capaces de producir derivados del metabolismo del ácido araquidónico vía lipoxigenasa como son 15-HETE, 8-15-di-HETE y LTB<sub>4</sub>, que son factores quimiotácticos de los neutrófilos (FQN), lo que justifica la infiltración de neutrófilos en infecciones virales, exposición al ozono, etc. Además, los 15-HETE estimulan la liberación de mediadores mastocitarios (100).

## **1.8. HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL.**

### **1.8.1. Concepto.**

Se considera la hiperreactividad bronquial (HB) como una respuesta exagerada de las vías aéreas, en forma de broncoespasmo, ante estímulos físicos, químicos o inmunológicos, que se manifiesta por obstrucción al flujo aéreo (101).

### **1.8.2. Clasificación.**

Se distingue la HB específica, en la que el estímulo es el antígeno y se observa en el asma bronquial extrínseco, y la HB inespecífica en la que los estímulos son inespecíficos, tales como el aire seco o frío, el esfuerzo, irritantes o agentes farmacológicos. Por tanto esta característica es común en todos los pacientes asmáticos sean extrínsecos o intrínsecos (102).

### **1.8.3. Mecanismos implicados.**

Son varios los mecanismos que se han implicado en la HB, como la disminución del diámetro de las vías aéreas, alteraciones celulares del músculo liso, desórdenes en la regulación autonómica y el daño epitelial (103,104,105,106).

En la actualidad se considera la inflamación de las vías aéreas como causa fundamental de la génesis y mantenimiento de la HB (6).

#### **1.8.4. Métodos de evaluación.**

Existen diferentes tests de provocación bronquial:

##### **1.8.4.1. Tests de provocación bronquial específica.**

###### **1.8.4.1.1. Tests con alergenios inhalados.**

Se utilizan en pacientes con asma bronquial extrínseco por sensibilización a determinados neumoalergenios como pueden ser los pólenes, los ácaros del polvo doméstico, los epitelios de animales y los hongos (107).

No se utilizan en la práctica habitual pues con la realización de una correcta historia clínica, pruebas cutáneas, determinación de Ig E total y específica y un test de provocación no específico se lleva a cabo un diagnóstico correcto.

En la actualidad su uso está limitado a la existencia de duda diagnóstica o cuando se debe valorar la respuesta tardía de los ataques asmáticos.

Existen diversos trabajos que demuestran una buena correlación entre los tests de provocación inhalativa específicos con alérgeno y los no específicos (108,109,110).

#### **1.8.4.1.2. Tests con inhalantes ocupacionales.**

El asma ocupacional se documenta con la monitorización del flujo espiratorio máximo (FEM) mediante medidores portátiles junto con la realización de pruebas cutáneas y determinación de anticuerpos "in vitro" (111).

En ocasiones es de interés realizar un test de provocación con las sustancias que el paciente utiliza en el medio laboral (112). De este modo se identifica cuál de todas las sustancias a las que está expuesto el paciente es la responsable y se puede confirmar si la respuesta es específica realizando la misma prueba en otra persona no expuesta.

#### **1.8.4.1.3. Tests con fármacos orales.**

Se llevan a cabo con la finalidad de conocer los posibles efectos adversos en asmáticos. Son útiles para comprobar la tolerancia a determinados antiinflamatorios no esteroideos (113).

#### **1.8.4.2. Tests de provocación bronquial inespecífica.**

##### **1.8.4.2.1. Tests con fármacos inhalados.**

Los más utilizados en la actualidad son la histamina y la metacolina (114). Se administran en forma de aerosol y producen broncoespasmo en sujetos susceptibles por aumento de la secreción traqueobronquial y contracción del músculo liso.

La potencia de ambos fármacos es comparable a igualdad de dosis. Producen efectos secundarios poco importantes y fugaces.

##### **1.8.4.2.2. Tests con fármacos orales.**

Se utilizan con muy poca frecuencia. Los más empleados en pacientes que presentan determinada patología asociada, son los  $\beta$ -bloqueantes (115).

##### **1.8.4.2.3. Tests con métodos físicos.**

Incluyen tests con ejercicio, hiperventilación isocápnica y aire frío y seco (116). El ejercicio puede desencadenar crisis de asma. Los tests de ejercicio fueron los primeros en utilizarse como test de provocación y todavía hoy se emplean como prueba diagnóstica en niños.

## **2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



## **2.1. HIPOTESIS.**

Dado que en el asma bronquial extrínseco por sensibilización a pólenes existe inflamación de las vías aéreas, incluso en épocas extraestacionales, debería ser posible objetivar esta inflamación mediante la cuantificación de marcadores de actividad proinflamatoria en el suero de los pacientes.

## **2.2. OBJETIVOS.**

Los objetivos del presente trabajo son:

1º Valorar el grado de severidad de la hiperreactividad bronquial en pacientes con asma por sensibilización a pólenes en época extraestacional.

2º Estudiar la presencia de la proteína catiónica y X del eosinófilo, mieloperoxidasa, triptasa y ácido hialurónico en el suero de los pacientes durante el período extraestacional, en fase estable asintomática.

3º Conocer si existe relación entre el grado de severidad de hiperreactividad bronquial y los marcadores séricos de inflamación en los pacientes asmáticos polínicos.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

### **3.1. POBLACION ESTUDIADA.**

#### **3.1.1. Criterios de inclusión y exclusión:**

Se han seleccionado los pacientes y los sujetos del grupo control atendiendo a los siguientes criterios:

- \* Los pacientes presentaban clínica sugestiva de enfermedad alérgica estacional: rinitis y/o asma bronquial extrínseco primaveral. El diagnóstico se confirmó mediante pruebas cutáneas y determinación de Ig E específica a pólen de gramíneas.

- \* En el momento de realizar el estudio debían estar asintomáticos, estables y sin realizar ningún tipo de tratamiento médico.

- \* Exploración física en el momento de realizar el estudio sin hallazgos y pruebas de función respiratoria basales, espirometría y curvas de flujo-volumen, dentro del rango de referencia.

- \* No existían datos en la historia clínica ni en la exploración física que indicasen patología que pudiese cursar con algún tipo de inflamación: enfermedad infecciosa, autoinmune, hematológica, osteoarticular ni cutánea en los 3 meses previos al estudio.

\* Los sujetos pertenecientes al grupo control no presentaban historia previa de polinosis ni tampoco presentaban datos de enfermedad inflamatoria. La exploración física sin hallazgos y el estudio de función respiratoria dentro del rango de referencia se consideraron condiciones necesarias para su inclusión en este grupo.

### **3.1.2. Grupos diagnósticos.**

Se han estudiado 82 pacientes procedentes de la consulta externa del Servicio de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario del Aire de Madrid. Los pacientes se dividieron en 2 grupos en función de la sintomatología presentada durante la época primaveral. Así mismo, se estudió un tercer grupo constituido por individuos considerados sanos.

#### **Grupo I: RINITIS.**

Formado por 29 pacientes con historia clínica compatible con rinoconjuntivitis alérgica estacional por sensibilización a pólenes. Entre los síntomas nasooculares que sugerían este diagnóstico se incluyeron: rinorrea acuosa, prurito nasocular, estornudos en salvas, obstrucción nasal, lacrimo e hiperemia conjuntival. Esta sintomatología se limitaba a los meses de primavera. Ninguno de estos sujetos refería clínica torácica. La edad

de los pacientes presentaba un mínimo de 17 y un máximo de 25 años ( $19,8 \pm 2$ ).

#### Grupo II: ASMA.

Constituido por 51 pacientes con historia clínica compatible con asma bronquial alérgico estacional por sensibilización a pólenes. Entre los síntomas de afectación torácica que referían para ser incluidos en este grupo se incluyeron: tos, disnea, sibilancias y opresión torácica. Estos síntomas se limitaban a la época primaveral. La edad presentaba un mínimo de 17 y un máximo de 29 años ( $20,5 \pm 2,6$ ).

Los pacientes pertenecientes a los grupos I y II no presentaban ningún síntoma, no utilizaban fármacos y realizaban una vida completamente normal. Atendiendo a estas características de las fases intercríticas se consideraron los sujetos del grupo II como asma tipo leve.

Se recogieron los datos referentes a años de evolución de la enfermedad y tratamiento con extractos desensibilizantes en ambos grupos.

#### Grupo III: CONTROL.

Constituido por 12 estudiantes de Medicina que se ofrecieron voluntarios para participar en este trabajo.

Ninguno de ellos presentaba historia clínica sugestiva de rinitis y/o asma alérgico estacional. La edad presentaba un mínimo de 20 y un máximo de 24 años ( $21,1 \pm 1,4$ ).

Todos los pacientes dieron su consentimiento tras ser informados de los objetivos del presente trabajo.

El estudio realizado se llevó a cabo durante los meses de octubre de 1992 a febrero de 1993, fuera de la época de polinización en Madrid (117).

#### **3.1.3. Tabaquismo.**

Los pacientes fueron interrogados acerca de su posible hábito tabáquico. Se consideraron fumadores aquellos que consumían más de 10 paquetes de cigarrillos por año (118,119).

#### **3.1.4. Edad.**

Todos los pacientes estudiados y los sujetos del grupo control estaban distribuidos entre los 17 y los 29 años de edad.

#### **3.1.5. Sexo.**

Todos los pacientes estudiados y los sujetos del grupo control eran varones.

### 3.2. PRUEBAS DIAGNOSTICAS "IN VIVO".

#### 3.2.1. Pruebas cutáneas.

Se realizaron las pruebas cutáneas en el Servicio de Alergia del Hospital del Aire. Se tuvieron en cuenta las precauciones habituales como la no administración previa de antihistamínicos que pudieran disminuir de forma significativa el resultado de las pruebas. Estas se llevaron a cabo en el borde cubital de la cara anterior de los antebrazos. Se valoró que no existiesen zonas de piel enferma ni antecedentes de dermatografismo. Se limpió la piel con alcohol etílico al 96% y se esperó hasta que estuviese totalmente seca antes de realizar las pruebas.

Se utilizaron extractos alergénicos del Laboratorio Alergia e Inmunología Abelló (Madrid) estandarizados biológicamente. Se estudiaron *Lolium perenne*, *Cynodon dactylon*, *Phragmites communis*, *Dactylis glomerata*, *Secale cereale*, *Olea europeae*, *Parietaria judaica*, *Artemisa vulgaris*, *Salsola kali*, *Plantago lanceolata*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Canis familiaris*, *Felis domesticus*, *Mucor racemosus*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria tenuis* y *Penicillium notatum*.

Para valorar las reacciones no específicas se utilizó control negativo con suero salino y para demostrar la

normal reactividad se utilizó histamina (10 mg/ml).

Se utilizaron lancetas Allergy pricker de acero esterilizadas de un solo uso de Dome Hollister Stier-Bayer. Son lancetas con una punta de 1 mm y unos topes a los lados para que sólo penetre la punta en la epidermis, evitándose la hemorragia. La lanceta se presiona, manteniéndose en un ángulo de 90° con la superficie cutánea, a través de la gota de la solución testada.

A los 15 minutos se examinaron los resultados. Con la finalidad de conseguir un registro permanente se dibujaron los contornos del habón con un rotulador fino y fueron transferidos mediante un papel adhesivo transparente a una hoja de papel. Se midieron con una regla milimetrada los diámetros mayor y menor de la pápula que forman ángulo recto entre sí, posteriormente se sumaron y se dividieron por dos (120).

### **3.2.2. Prueba de hiperreactividad bronquial inespecífica.**

Estas pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio de pruebas funcionales del Servicio de Neumología del Hospital del Aire (121).



### **3.2.2.1. Equipo técnico y reactivos.**

Se utilizó metacolina (Roche) para la realización del test de broncoconstricción. El disolvente empleado para la preparación de las disoluciones de metacolina se elaboró en el Servicio de Farmacia del Hospital del Aire. Es una solución salina tamponada que contiene 0,5% de ClNa, un 0,275% de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  y un 0,4% de fenol, para minimizar el efecto de la acidez sobre las vías aéreas.

Para realizar las espirometrías se utilizó un espirómetro Pneumscreen-II (Erich Jaeger, GmbH&co. KG).

El nebulizador empleado, para aerosolizar la metacolina, fue un Hudson 1499 y la energía necesaria para ello fue suministrada a partir de una fuente de oxígeno con un manómetro, para ajustar el caudal necesario.

Entre otro pequeño material utilizado, cabe citar:

- \* Un tubo corrugado de 1 m.
- \* Jeringuillas de un solo uso.
- \* Pinzas nasales.

### **3.2.2.2. Metodología del test.**

Todas las personas fueron interrogadas, mediante un cuestionario sobre síntomas respiratorios modificado del Medical Research Council's Committee (122), con el fin de

realizar una anamnesis previa a la provocación bronquial de todos aquellos factores que pueden introducir cambios "per se" en la sensibilidad bronquial y por tanto en la respuesta al estímulo, respetando los intervalos de tiempo durante los cuales la sensibilidad se ve alterada.

Comenzó la exploración con las explicaciones e instrucciones necesarias a la persona a explorar, para lograr la máxima colaboración de la misma.

Se realizó una espirometría basal con la persona sentada erecta, con la nariz ocluída por pinzas y soplando sobre una boquilla indeformable, para evitar artefactos. Para la valoración de la espirometría efectuada se obtuvo siempre un mínimo de tres maniobras de espiración forzada, no debiendo variar entre sí las dos mejores espiraciones de las tres curvas aceptables más de un 5% de la FVC. Los valores de los parámetros obtenidos (FVC, FEV1, PEF e índice de Tiffeneau) se expresaron en porcentajes del valor de referencia. Se continuó el estudio cuando el FEV1 basal era igual o mayor al 80% de referencia.

A continuación se realizó el test de provocación, con inhalación del disolvente y disoluciones crecientes de metacolina. Se utilizó un nebulizador Hudson con un flujo de oxígeno de 7 l/min., con el cual se consigue un tamaño de partícula, en diámetro aerodinámico de masa media, de 1,6  $\mu$ . Se colocó un tubo corrugado, de 1 m de longitud y 3

cm de diámetro, entre el nebulizador y la boquilla para uniformar el tamaño de las partículas inhaladas. El aerosol se genera de forma continua pero se administraba con inhalaciones intermitentes.

Tras la realización de la espirometría basal se procedía a la inhalación del disolvente. Tanto en este caso como en la inhalación de cada una de las disoluciones de metacolina se realizaron cinco inhalaciones profundas desde CRF a CPT. Los valores espirométricos observados a los tres minutos sirvieron de referencia para subsiguientes comparaciones, en caso de ser la respuesta negativa. El cálculo de estos valores, para cada parámetro respectivo, se realizó como anteriormente se ha descrito. Si el FEV1 mostraba una respuesta significativa, es decir, un descenso del 20%, se confirmaba de nuevo a los tres minutos, ya que la respuesta bronquial así conseguida, si es muy lábil, puede desaparecer rápidamente. Si continuaba siendo significativa se suspendía la prueba, ya que se consideraba positiva. Si la respuesta era lábil y volvía a valores no significativos, éstos eran los que entonces servían de referencia para las subsiguientes comparaciones y se iniciaba la inhalación del fármaco, comenzando por la concentración inferior y repitiendo la espirometría de igual forma, a los tres minutos. Si la respuesta no era significativa, se proseguía utilizando las concentraciones del fármaco hasta alcanzar la dosis acumulada superior de 330 unidades inhaladas (UI). Una respuesta significativa se

confirmaba siempre a los tres minutos. Si el cambio aún no era significativo, el test se informaba como negativo, al no haber podido demostrarse la existencia de hiperreactividad bronquial.

Por último, una vez finalizada la prueba, se administraban dos inhalaciones de salbutamol en forma de aerosol presurizado para revertir la broncoconstricción provocada.

En la TABLA IV se refleja la dosis acumulada de fármaco broncoconstrictor (metacolina) utilizada durante la prueba:

Concentración (mg/ml)	Nº de respiraciones	UI por 5 respiraciones	Dosis acumulada(UA)
1	5	5	5
5	5	25	30
10	5	50	80
25	5	125	205
25	5	125	330

TABLA IV: Dosis acumulada (UA) de metacolina.

Nota.- 1 unidad inhalada (UI)= una inhalación de una solución que contiene 1 mg/ml de sustancia activa.

De forma arbitraria se definió la hiperreactividad bronquial (HB) como severa, moderada, leve o inexistente según que los valores de PD20FEV1 fueran inferiores o iguales a 50, 200, 330 o mayores de 330 UA de metacolina, respectivamente.

### **3.3. PRUEBAS DIAGNOSTICAS "IN VITRO".**

#### **3.3.1. Recogida de muestras.**

La obtención de la muestra hemática para realizar el recuento de eosinófilos se llevó a cabo mediante venopunción con sistema vacutainer con EDTA. Para estudiar los marcadores se extrajeron muestras mediante sistema vacutainer con silicagel en condiciones estériles. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente entre 60 y 120 minutos, al cabo de los cuales se obtuvo el suero mediante centrifugación a 700 g ( equivalente a 2000 rpm en la centrífuga GLC-2 Sorvall ) durante 10 minutos. Los sueros se congelaron a -20°C y se almacenaron hasta la posterior determinación de los distintos marcadores.

#### **3.3.2. Recuento de eosinófilos.**

Se realizó el recuento absoluto de eosinófilos en sangre periférica utilizando colorante de eosinófilos compuesto de eosina amarilla (0,05 gr) (Serva), fenol 95% (0,5 ml) (Scharlau) y formaldehido (0,5 ml) (Sigma)

disuelto en 100 ml de agua destilada.

Se estudió sangre periférica de los pacientes diluida a 1/10 (10  $\mu$ l sangre y 90  $\mu$ l de colorante).

Se utilizó una cámara de Fuchs-Rosenthal para la lectura, determinándose el número de eosinófilos por  $\mu$ l mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de eosinófilos} \times 10}{3}$$

### 3.3.3. Determinación de Ig E total.

La Ig E total se determinó mediante el sistema CAP de Pharmacia Diagnostics (Uppsala.Suecia), basado en un fluoroenzimoinmunoensayo.

#### 3.3.3.1. Principio del procedimiento.

La Ig E total sérica del paciente reacciona con la anti-Ig E, unida covalentemente al inmunoCAP, fase sólida que consiste en un polímero hidrofílico encerrado en una cápsula (123). Después del lavado, se añaden anticuerpos contra Ig E marcados con una enzima para formar un complejo. Tras la incubación, el enzima anti-Ig E no unido es eliminado mediante lavado y el complejo unido se incuba con un agente de revelado. Después de parar la reacción se mide la fluorescencia en el FluoroCount 96, siendo ésta

directamente proporcional a la concentración de Ig E en la muestra sérica.

### 3.3.3.2. Equipo Pharmacia CAP system.

Consta de equipo y programa informático necesarios para trabajar en laboratorios de inmunología.

El equipo material incluye un aparato de posición de muestras (Positioning Guide 96), un dispensador de CAP (Immuno CAP dispenser), placas de ensayo, un aparato automático lavador (Assay Washer 96) y un contador de fluorescencia (FluoroCount 96).

Incluye un programa informático "Phamas" que permite preparar, manejar y procesar los ensayos, recoger y evaluar los datos obtenidos y finalmente emitir los informes correspondientes.

### 3.3.3.3. Reactivos.

Enzima anti-Ig E β-Galactosidasa (antisuero monoclonal obtenido de conejo y ratón) 5,1 ml.	1 vial
Solución de revelado 4-Metilumbeliferil-β-D-galactósido. 6 ml.	1 vial

Solución de parada, 50 ml.	1 vial
Patrones Ig E Concentraciones: 2; 10; 50; 200; 1000 y 2000 kU/l, 0,8 ml.	6 viales

#### 3.3.3.4. Procedimiento.

\* Volumen en cada pocillo:

Muestra	50 $\mu$ l
Enzima anti-Ig E	50 $\mu$ l
Solución de desarrollo	50 $\mu$ l
Solución de parada	400 $\mu$ l
Tiempo de incubación: 1ª incubación	30 $\pm$ 5 min
2ª incubación	150 $\pm$ 10 min
3ª incubación	10 $\pm$ 1 min
Temperatura de incubación:	18-32° C

\* Procedimiento de la prueba.

Los ensayos se realizaron por duplicado de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

#### 3.3.3.5. Características del ensayo.

\* Coeficiente de variación: <10%.

\* Límite teórico de detección: < 2KU/l.

\* Recuperación: 95  $\pm$  35.

\* Rango de referencia: <100 KU/l.



- \* Límite práctico mínimo: 2 KU/l.
- \* Límite práctico máximo: 2000 KU/l.

#### **3.3.4. Determinación de Ig E específica.**

Se realizó mediante el sistema CAP de Pharmacia Diagnostics (Uppsala. Suecia) basado en un fluoroenzimoinmunoensayo. Se determinó la Ig E específica frente a *Lolium perenne*.

##### **3.3.4.1. Principio del procedimiento.**

El alérgeno, unido covalentemente al inmunoCAP, reacciona con la Ig E específica existente en la muestra sérica del paciente. Después de lavar la Ig E no específica, se añaden anticuerpos marcados con enzima para formar un complejo. Tras la incubación se lava el enzima anti-Ig E no unido y posteriormente el complejo se incuba con un agente de revelado. Después de parar la reacción se mide la fluorescencia del eluido en un FluoroCount 96. Cuanto más alto sea el valor de la fluorescencia medida mayor será la concentración de Ig E específica presente en la muestra.

##### **3.3.4.2. Equipo Pharmacia CAP system.**

Descrito anteriormente en el apartado 3.3.3.2.

#### 3.3.4.3. Reactivos.

Enzima anti-Ig E, $\beta$ -galactosidasa (antisuero monoclonal obtenido de conejo) 5,1 ml.	1 vial
Solución de revelado 4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactósido, 6 ml.	1 vial
Solución de parada, 50 ml.	1 vial
Anti-Ig E inmunoCAP (antisuero obtenido en oveja) 16 inmunoCAP/portador	6 portadores
Ig E patrones Concentraciones: 0,35; 0,7; 3,5; 17,5; 50 y 100 kU/l, 1,1 ml.	6 viales

#### 3.3.4.4. Procedimiento.

Descrito anteriormente en 3.3.3.4..

#### 3.3.4.5. Características del ensayo.

- \* Coeficiente de variación: <10%.
- \* Límite teórico de detección: 0,35 KU/l.
- \* Rango de referencia: <0,7 KU/l.
- \* Límite de detección práctico mínimo: 0 KU/l.
- \* Límite de detección práctico máximo: 100 KU/l.

La cuantificación de Ig E específica permite

establecer las siguientes clases:

Clase	Menor de (KU/l)	Mayor de (KU/l)	Nivel de Ig E
6	-	100	Muy alto
5	100	50	Muy alto
4	50	17,5	Muy alto
3	17,5	3,5	Alto
2	3,5	0,7	Moderado
1	0,7	0,35	Bajo
0	0,35	-	Ausente

TABLA V: Niveles de Ig E específica agrupados en clases.

### **3.3.5. Determinación de marcadores de activación proinflamatorios.**

Los marcadores de activación proinflamatorios se determinaron mediante radioinmunoanálisis (RIA) en el Servicio de Medicina Nuclear del Hospital del Aire.

#### **3.3.5.1. Proteína catiónica del eosinófilo (PCE) .**

Se utilizaron para su determinación equipos de investigación ECP-RIA de Pharmacia Diagnostics AB (Uppsala.

Suecia).

#### 3.3.5.1.1. Principio del procedimiento.

Es un ensayo cuantitativo basado en un RIA con doble anticuerpo marcado con  $^{125}\text{I}$ . La PCE en la muestra compete por los centros de unión de anticuerpos específicos con una cantidad fija de PCE marcada con  $^{125}\text{I}$ . La PCE libre y unida son separadas por adición de un segundo anticuerpo inmuoabsorbente y posterior centrifugación y decantación. La radiactividad presente en el precipitado es entonces medida siendo inversamente proporcional a la concentración de PCE en la muestra.

#### 3.3.5.1.2. Reactivos.

Cada equipo de Pharmacia ECP-RIA contiene reactivos para 50 tubos, suficientes para estudiar 19 muestras y una curva patrón por duplicado. Todas las muestras se estudiaron utilizando reactivos pertenecientes a los mismos lotes.

Patrones PCE (humana)	
0 $\mu\text{g/l}$ , 5 ml.	1 vial
2; 5; 15; 100 and 200 $\mu\text{g/l}$ , 0,5 ml cada.	5 viales
Anti-PCE (antisuero desarrollado en conejo) 3 ml	1 vial

PCE- <sup>125</sup> I 12 ng, 43,7 kBq (1,2 µCi), 3 ml.	1 vial
Suspensión de decantación (Sepharosa Ig G anti conejo desarrollada en oveja), 220 ml	1 vial

Para este ensayo, así como para la totalidad de marcadores (PXE, TRP, MPO y AH), se siguieron las normas vigentes respecto al almacenamiento, utilización y eliminación de residuos de materiales radiactivos emitidas por el Consejo de Seguridad Nuclear.

#### 3.3.5.1.3. Calibración.

Los patrones de PCE se calibraron frente PCE pura preparada de acuerdo con el método de Peterson, Jörnvall y Venge (124).

El estudio de comparación (Y) entre PCE-RIA (X) y el método de Venge y col. da el siguiente resultado:

$$Y = -3,2 + 3,0X$$

$$r = 0,88$$

#### 3.3.5.1.4. Procedimiento.

Material: además del referido en el apartado de reactivos, pipetas de repetición de 50 y 2000 µl, micropipeta de 50 µl y tubos de centrifuga de poliestireno.

Se utilizó además un contador gamma Gamma Chem 9612 (Lab System).

Los parámetros del método utilizados fueron:

- |                             |                   |
|-----------------------------|-------------------|
| - volumen de la muestra     | 50 $\mu$ l suero  |
| - volumen de la 1ª reacción | 150 $\mu$ l       |
| - volumen de la 2ª reacción | 2150 $\mu$ l      |
| - tiempo de incubación      | 3 horas y 30 min. |
| - temperatura               | ambiente          |

El procedimiento del ensayo incluyó los siguientes pasos.

Pasos de trabajo	Patrones	Muestras Control
1. Patrones	50 $\mu$ l	-
2. Muestras y Controles	-	50 $\mu$ l
3. PCE-I <sup>125</sup>	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
4. Anti-PCE	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
5. Agitar para asegurar la mezcla Incubar 3 h. a Tª ambiente.		
6. Decantar la suspensión. Agitar el vial para homogeneizar la suspensión.	2 ml	2 ml
7. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.		

8. Centrifugar 10 minutos a 525g Decantar los tubos inmediatamente y aspiración del sobrenadante mediante bomba de vacío.		
--	--	--

Se midió la radiactividad en un contador gamma Gamma Chem 9612 (Lab System) durante 1 minuto.

#### 3.3.5.1.5. Características del ensayo.

- \* Coeficiente de variación intraensayo: < 10%.
- \* Coeficiente de variación interensayo: < 30%.
- \* Límite de detección teórico: < 2 µg/l.
- \* Recuperación: 103±3%.
- \* Límite de detección práctico mínimo obtenido: 0,054 µg/l.
- \* Límite de detección práctico máximo obtenido: 7976,6 µg/l.
- \* Coeficiente de ajuste de la curva patrón: 0,998.

#### 3.3.5.2. Proteína X del eosinófilo (PXE).

Se utilizaron para su determinación equipos de investigación EPX-RIA Pharmacia Diagnostics (Uppsala.Suecia).

##### 3.3.5.2.1. Principio del procedimiento.

Es un ensayo cuantitativo basado en un doble

anticuerpo marcado con  $^{125}\text{I}$ . La PXE en la muestra compete por los centros de unión específicos con una concentración calibrada de PXE marcada con  $^{125}\text{I}$ . La PXE libre se separa por adición de un segundo anticuerpo inmuoabsorbente seguido de un proceso de centrifugación y aspiración en bomba de vacío. La radiactividad del precipitado es entonces medida, siendo inversamente proporcional a la cantidad de PXE presente en la muestra.

#### 3.3.5.2.2. Reactivos.

Cada equipo de Pharmacia EPX-RIA contiene reactivos para ensayos de 50 tubos, suficientes para 18 muestras y una curva patrón por duplicado. Todas las muestras se estudiaron utilizando reactivos pertenecientes a los mismos lotes.

Patrones PXE (humana)	
0 $\mu\text{g/l}$ , 5 ml	1 vial
3; 8; 20; 50; 150 y 400 $\mu\text{g/l}$ , 0,5 ml cada uno	6 viales
PXE $^{125}\text{I}$ 24 ng, 71,3 kBq ( 1,9 $\mu\text{g/Ci}$ ), 3 ml.	1 vial
Anti PXE (antisuero obtenido de conejo) 3 ml.	1 vial
Suspensión de decantación (Sepharosa Ig G anti conejo obtenido en oveja), 220 ml	1 vial



### 3.3.5.2.3. Procedimiento.

El material utilizado fue: los reactivos descritos anteriormente, pipetas de repetición de 50 y 2000  $\mu$ l, micropipeta de 50  $\mu$ l y tubos de centrifuga de poliestireno. Se utilizó además el contador gamma ya descrito.

Parámetros del procedimiento:

- volumen de la muestra 50  $\mu$ l suero
- volumen de la 1ª reacción 150  $\mu$ l
- volumen de la 2ª reacción 2150  $\mu$ l
- tiempo de incubación 3 horas y 30 min.
- temperatura de incubación ambiente

El procedimiento del ensayo incluyó las siguientes etapas:

Pasos de trabajo	Patrones	Muestras Control
1. Patrones	50 $\mu$ l	-
2. Muestras y controles	-	50 $\mu$ l
3. PXE <sup>125</sup> I	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
4. Anti PXE	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
5. Agitar los tubos del ensayo para asegurar la mezcla.		

6. Aspirar la suspensión	2 ml	2 ml
7. Incubar 30 minutos a t° ambiente		
8. Centrifugar 10 min a 525g. Aspirar el sobrenadante mediante bomba de vacio		

A continuación se midió la radiactividad en un contador gamma.

#### 3.3.5.2.4. Características del ensayo.

- \* Coeficiente de variación intraensayo: <10%.
- \* Coeficiente de variación interensayo: <30%.
- \* Límite de detección teórico: <3 µg/l.
- \* Recuperación: 99±3%.
- \* Límite de detección práctico mínimo obtenido: 0,379 µg/l.
- \* Límite de detección práctico máximo obtenido: 18418,47 µg/l.
- \* Coeficiente de ajuste de la curva patrón: r=0,996.

#### 3.3.5.3. Mieloperoxidasa (MPO).

Para su determinación se utilizaron equipos de investigación MPO-RIA Pharmacia Diagnostics (Uppsala, Suecia).

### 3.3.5.3.1. Principio del procedimiento.

El procedimiento se basa en un radioinmunoensayo de doble anticuerpo. La MPO en la muestra compete por los centros de unión de los anticuerpos específicos con una concentración fija de MPO marcada con  $^{125}\text{I}$ . La MPO libre y unida se separan por la adición de un segundo anticuerpo inmunosorbente seguida de un proceso de centrifugación y decantación. Se mide entonces la radiactividad en el precipitado, siendo inversamente proporcional a la cantidad de MPO en la muestra.

### 3.3.5.3.2. Reactivos.

Patrones MPO (humana) 0 $\mu\text{g/l}$ , 5 ml 8; 20; 50; 200; 500 y 1000 $\mu\text{g/l}$ , 0,5 ml cada uno	1 vial 6 viales
MPO $^{125}\text{I}$ 60 ng, 45,2 kBq (1,2 $\mu\text{Ci}$ ), 3 ml.	1 vial
Anti-MPO (antisuero obtenido de conejo), 3 ml.	1 vial
Suspensión decantación (Sepharosa, Ig G anticonejo obtenida de oveja), 110 ml.	1 vial

### 3.3.5.3.3. Procedimiento.

Etapas	Patrones	Muestras Controles
1. Patrones	50 $\mu$ l	-
2. Muestras/ controles	-	50 $\mu$ l
3. MPO- <sup>125</sup> I	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
4. Anti-MPO	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
5. Agitar los tubos para asegurar la mezcla. Incubar 3 h a t° ambiente.		
6. Suspensión de decantación	2 ml	2 ml
7. Incubar 30 minutos a t° ambiente.		
8. Centrifugar 10 minutos a 525g. y aspirar el sobrenadante mediante bomba de vacío		

Se midió la radiactividad en un contador gamma.

### 3.3.5.3.4. Características del ensayo.

- \* Coeficiente de variación total intraensayo:< 10%.
- \* Coeficiente de variación total interensayo:< 30%.
- \* Límite de detección teórico: 8  $\mu$ g/l.
- \* Recuperación: 99 $\pm$ 3%.

- \* Límite de detección práctico mínimo obtenido: 1,69  $\mu\text{g/l}$ .
- \* Límite de detección práctico máximo obtenido: 5817,4  $\mu\text{g/l}$ .
- \* Coeficiente de ajuste de la curva patrón:  $r=0,998$ .

#### **3.3.5.4. Acido hialurónico (AH).**

Se utilizaron para su determinación equipos de investigación AH-RIA de Pharmacia Diagnostics (Uppsala.Suecia) .

##### **3.3.5.4.1. Principio del procedimiento.**

Se trata de un ensayo radiométrico basado en la utilización de proteínas fijadoras específicas de ácido hialurónico (hyaluronic acid binding proteins : HABP) aisladas de cartílago bovino.

##### **3.3.5.4.2. Reactivos.**

- Patrones: 10; 25; 75; 200 y 500  $\mu\text{g/l}$ .
- Patrón cero (diluyente de la muestra).
- $^{125}\text{I}$ -HABP, 200 kBq (5  $\mu\text{Ci}$ ).
- Diluyente trazador (azul).
- HA-Sepharosa (amarillo).
- Suspensión de precipitación.

#### 3.3.5.4.3. Procedimiento.

\* Volúmenes:

- Muestra 100  $\mu$ l
- $^{125}\text{I}$ -HABP 200  $\mu$ l
- HA-Sepharosa 100  $\mu$ l
- Suspensión de precipitación 2 ml

\* Tiempo de incubación y temperatura:

- 60 minutos + 46-60 minutos (4-22°C).
- Centrifugar 10 minutos a 525 g.

El AH de la muestra del paciente reacciona con HABP marcado con  $^{125}\text{I}$ .  $^{125}\text{I}$ -HABP libre es cuantificado mediante incubación con HA unido covalentemente a partículas de Sepharosa de pequeño tamaño y baja densidad. La separación se lleva a cabo por centrifugación seguida de decantación. La radiactividad fijada a las partículas se mide en un contador gamma y la medida es directamente proporcional a la concentración de AH presente en la muestra.

#### 3.3.5.4.4. Características del ensayo.

- \* Coeficiente de variación intraensayo: < 8,1%.
- \* Coeficiente de variación interensayo: < 30%.
- \* Límite de detección teórico: <5  $\mu\text{g/l}$ .
- \* Recuperación: 97 $\pm$ 5%.
- \* Límite de detección práctico mínimo obtenido: 0,457  $\mu\text{g/l}$ .
- \* Límite de detección práctico máximo obtenido:

14105,4  $\mu\text{g/l}$ .

\* Coeficiente de ajuste de la curva patrón:  $r=0,992$ .

### 3.3.5.5. Triptasa (TRP).

Se determinó mediante equipos de investigación Tryptase-RIACT de Pharmacia Diagnostics (Uppsala. Suecia).

#### 3.3.5.5.1. Principio del procedimiento.

Es un ensayo inmunoradiométrico en fase sólida basado en anticuerpos marcados con  $^{125}\text{I}$ .

#### 3.3.5.5.2. Reactivos.

Patrones TRP mastocitaria (humana) 0 U/l, 8ml 2; 5; 10; 20 y 50 U/l, 1,5 ml cada uno	1 vial 5 viales
Diluyente de la muestra, 8 ml.	1 vial
$^{125}\text{I}$ -anti-triptasa (monoclonal ratón) 0,6 mg, 311 kBq (8,5 $\mu\text{Ci}$ ), 3 ml.	1 vial
Tubos revestidos con anti-triptasa (monoclonal de ratón)	5 paquetes
Cloruro sódico, 9 g	1 bolsa

#### 3.3.5.5.3. Procedimiento del ensayo.

A cada tubo con anti-triptasa se le añaden 100  $\mu$ l de patrón o 50  $\mu$ l de muestra con 50  $\mu$ l de diluyente. Se añaden 50  $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -anti-triptasa y se incuba durante la noche a temperatura ambiente. Se lava tres veces con 2 ml de solución de lavado y se lee la radiactividad en un contador gamma.

#### 3.3.5.5.4. Características del ensayo.

- \* Coeficiente de variación intraensayo: < 10%.
- \* Coeficiente de variación interensayo: < 30%.
- \* Límite de detección teórico: inexistente.
- \* Recuperación: 94-109%.
- \* Límite de detección práctico mínimo obtenido: 0,86  $\mu\text{g/l}$ .
- \* Límite de detección práctico máximo obtenido: 454,6  $\mu\text{g/l}$ .
- \* Coeficiente de ajuste de la curva patrón:  $r=0,971$ .

### 3.4. METODOLOGIA ESTADISTICA.

#### 3.4.1. Soporte informático.

El análisis estadístico fue realizado con un ordenador personal Olivetti 386DX. Se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows y el paquete gráfico Harvard Graphics 3.0.



#### **3.4.2. Estudio del ajuste a la normal.**

Antes de llevar a cabo el análisis estadístico de los datos se comprobó su ajuste o no a una distribución normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

#### **3.4.3. Estadística descriptiva.**

En las variables numéricas que se ajustaban a una distribución normal se describió el tamaño, la media, la desviación típica y el error standard.

En las variables numéricas que no se ajustaban a la normal se describió el tamaño, la mediana, la moda, valores mínimos y máximo y el rango.

Las variables cualitativas se describieron por sus frecuencias.

#### **3.4.4. Estadística analítica. Parámetros cuantitativos.**

La comparación entre diferentes grupos de datos que se ajustaban a la normal se realizó mediante comparación de medias independientes.

Cuando los datos no se ajustaban a la normal se utilizó la prueba de Mann-Whitney.

#### **3.4.5. Estudio de correlación.**

Se analizó el coeficiente de correlación lineal entre parejas de variables cuantitativas mediante la obtención de matrices dos a dos de todas las variables estudiadas.

Si las dos muestras se ajustaban a la normal se empleó el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Cuando al menos una de las muestras no se ajustaba a la normal se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman.

#### **3.4.6. Nivel de significación.**

En todos los casos se tomó como nivel aceptado de significación el correspondiente a un error alfa ( $p$ ) menor de 0,05.

#### **3.4.7. Evaluación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la prueba.**

Para evaluar las características de cada uno de los marcadores se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo a diferentes concentraciones de los marcadores.

Posteriormente se representó la Curva Característica Operador Receptor de sensibilidad y especificidad y

siguiendo a Galen y Gambino (125) se utilizó el punto de corte de ambas curvas como nivel crítico de decisión para discernir entre los dos grupos estudiados.

### **3.5. Búsqueda bibliográfica.**

La revisión bibliográfica se realizó mediante búsqueda en la base de datos NLM Medline en CD-ROM (SilverPlatter) (enero 1978-agosto 1993) e Índice Médico Español (Micronet) (enero 1978-agosto 1993), así como por las referencias de los artículos obtenidos.

#### **4. RESULTADOS**

**ESTRUCTURA DE DATOS (SPSS): 92 fichas y 26 variables**

Número	Nombre	Tipo
1	edad (años)	cuantitativa
2	diagnóstico	cualitativa
3	tabaquismo	cualitativa
4	eosinófilos ( $\text{n}^{\circ}/\mu\text{l}$ )	cuantitativa
5	Ig E total (KU/l)	cuantitativa
6	Ig E específica	cualitativa
7	Ig E específica (KU/l)	cuantitativa
8	Acido hialurónico ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	cuantitativa
9	PCE ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	cuantitativa
10	PXE ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	cuantitativa
11	MPO ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	cuantitativa
12	PD20 metacolina (UA)	cuantitativa
13	años de evolución	cuantitativa
14	inmunoterapia	cualitativa
15	severidad de HB	cualitativa
16	años de inmunoterapia	cuantitativa
17	pápula polen (mm)	cuantitativa
18	pápula histamina (mm)	cuantitativa
19	FEV1 absoluto (l)	cuantitativa
20	FEV1 (% del teórico)	cuantitativa
21	FVC absoluto (l)	cuantitativa
22	FVC (% del teórico)	cuantitativa
23	PEF absoluto (l/seg)	cuantitativa
24	PEF (% del teórico)	cuantitativa
25	Tiffeneau	cuantitativa
26	Tiffeneau (% del teórico)	cuantitativa

	edad	diagnos	tabaco	eosinoa	iget	igee	igee	hialur	ecp	epx	mpo	metacol	tiempo
1	24	SANO	NO	123	34	NEG	0	12	4	22	339	330	Sano
2	24	SANO	NO	80	150	NEG	0	5	3	21	330	330	Sano
3	21	SANO	NO	106	19	NEG	0	9	8	15	495	330	Sano
4	22	SANO	NO	63	16	NEG	0	50	3	17	377	330	Sano
5	21	SANO	NO	69	11	NEG	0	3	17	39	387	330	Sano
6	20	SANO	NO	86	19	NEG	0	14	16	47	764	330	Sano
7	20	SANO	NO	133	9	NEG	0	9	13	15	488	330	Sano
8	20	SANO	NO	63	35	NEG	0	0	10	10	853	330	Sano
9	20	SANO	NO	56	88	NEG	0	0	13	23	906	330	Sano
10	20	SANO	NO	193	15	NEG	0	25	7	13	343	330	Sano
11	21	SANO	NO	116	102	NEG	0	33	7	19	674	330	Sano
12	21	SANO	NO	116	60	NEG	0	33	2	16	305	330	Sano
13	20	ASMA	SI	200	100	GRA	63	31	11	35	1422	110	6
14	18	ASMA	SI	103	84	LEV	30	38	18	18	975	330	2
15	20	ASMA	SI	146	188	GRA	100	29	11	24	998	299	10
16	18	ASMA	SI	180	135	MO	11	40	31	52	876	4	10
17	18	ASMA	SI	79	174	LEV	2	29	33	55	No re	100	6
18	19	ASMA	SI	373	100	MO	11	76	21	58	1161	60	8
19	19	ASMA	SI	129	95	LEV	2	31	24	29	1152	14	8
20	20	ASMA	SI	139	122	LEV	1	48	6	15	574	45	8
21	18	ASMA	SI	576	541	GRA	6	27	65	80	2577	40	8
22	17	ASMA	SI	213	214	GRA	64	40	12	20	793	13	10
23	18	ASMA	SI	189	440	GRA	6	69	29	27	No re	40	10
24	22	ASMA	SI	149	561	GRA	91	33	18	27	1028	299	8
25	29	ASMA	SI	73	136	GRA	54	33	5	25	560	330	20
26	18	ASMA	SI	123	121	GRA	100	26	74	100	2000	70	5
27	23	ASMA	SI	219	580	MO	46	22	45	31	2000	200	12
28	20	ASMA	SI	43	168	GRA	100	29	33	23	2000	60	14
29	24	ASMA	SI	66	597	MO	21	100	28	56	2000	250	5
30	20	ASMA	SI	153	376	MO	18	13	27	33	487	330	8
31	26	ASMA	NO	356	68	MO	40	34	23	47	5817	16	8
32	22	ASMA	NO	133	37	MO	20	33	13	32	622	330	15
33	22	ASMA	NO	130	28	MO	13	29	10	31	650	110	12
34	18	ASMA	NO	400	316	GRA	100	23	76	121	2076	12	7
35	19	ASMA	NO	229	611	GRA	82	33	71	59	805	95	12
36	22	ASMA	NO	129	171	GRA	100	29	15	18	1006	110	6
37	17	ASMA	NO	289	137	GRA	100	55	17	21	1047	110	14

	inmunote	meta_sev	tto_it	polen	hista	fev1	fev1_por	fvc	fvc_por	pef	pef_por
1	9	Negativa	0	0	5	4,92	113	5,77	114	9,98	101
2	9	Negativa	0	0	5	4,78	140	4,70	107	11,1	120
3	9	Negativa	0	0	6	5,40	118	6,28	110	12,0	125
4	9	Negativa	0	0	6	4,45	102	5,20	103	10,0	101
5	9	Negativa	0	0	6	5,50	110	6,35	108	13,0	120
6	9	Negativa	0	0	6	4,10	100	5,20	110	8,40	103
7	9	Negativa	0	0	6	4,56	100	4,75	92	9,30	120
8	9	Negativa	0	0	6	4,08	95	5,10	96	9,61	90
9	9	Negativa	0	0	8	4,84	105	5,66	107	8,15	105
10	9	Negativa	0	0	8	4,60	110	5,18	105	10,9	115
11	9	Negativa	0	0	5	4,84	115	5,42	110	9,30	90
12	9	Negativa	0	0	6	4,70	110	5,27	104	10,9	113
13	si	Moderada	3	15	10	5,44	132	5,78	121	11,8	123
14	si	Negativa	1	14	6	5,48	119	6,21	113	11,1	125
15	si	Leve	4	11	4	4,46	118	5,67	116	10,7	111
16	si	Severa	4	6	7	4,92	118	5,98	120	10,3	124
17	si	Moderada	2	12	7	4,00	129	4,49	120	7,61	118
18	si	Moderada	2	15	5	4,40	135	4,90	125	9,22	137
19	si	Severa	3	7	6	5,32	127	6,06	121	10,2	123
20	si	Severa	3	10	4	4,76	113	5,24	108	10,7	111
21	si	Severa	2	10	4	4,92	126	6,15	131	8,49	108
22	si	Severa	4	13	5	5,52	150	6,30	143	9,03	122
23	si	Severa	4	15	7	4,92	151	5,13	130	11,1	165
24	si	Leve	4	10	5	3,80	92	4,33	90	10,3	108
25	si	Negativa	10	16	5	4,92	108	5,47	100	11,9	118
26	si	Moderada	3	6	4	4,36	103	4,88	96	10,9	130
27	si	Moderada	10	10	5	3,84	90	4,32	86	10,3	105
28	si	Moderada	6	9	7	3,72	91	4,13	88	8,52	89
29	si	Leve	3	14	7	4,72	107	5,60	107	9,65	96
30	si	Negativa	6	10	4	3,76	93	4,75	102	8,93	95
31	si	Severa	2	11	7	4,28	87	3,96	95	9,80	101
32	si	Negativa	10	8	4	4,48	105	4,83	97	9,70	100
33	si	Moderada	7	6	6	4,48	106	4,96	100	11,8	126
34	si	Severa	5	10	7	5,36	141	5,45	120	15,0	97
35	si	Moderada	5	11	6	4,48	102	5,50	107	10,1	101
36	si	Moderada	2	20	7	4,76	104	5,08	99	14,6	143
37	si	Moderada	3	14	7	5,52	146	5,76	126	11,3	148

	tiffenea	tiff_por
1	85,0	102
2	90,0	108
3	88,0	104
4	82,0	98
5	86,0	103
6	80,0	92
7	96,0	115
8	85,0	96
9	85,0	94
10	90,0	109
11	92,0	107
12	89,0	108
13	94,1	113
14	88,3	104
15	87,4	105
16	82,3	97
17	89,2	106
18	89,7	106
19	87,8	104
20	90,8	109
21	80,0	95
22	87,6	104
23	96,0	113
24	87,7	105
25	90,0	110
26	89,3	106
27	89,0	107
28	90,1	108
29	84,2	102
30	79,2	95
31	90,1	105
32	92,7	111
33	90,3	108
34	98,4	116
35	81,5	97
36	93,6	112
37	95,9	113



	edad	diagnos	tabaco	eosinoa	iget	igee	igee	hialur	ecp	epx	mpo	metacol	tiempo
38	18	ASMA	NO	513	182	GRA	32	34	33	61	741	90	14
39	19	ASMA	NO	256	500	MO	6	45	24	41	1763	4	12
40	24	ASMA	NO	123	292	GRA	66	44	30	60	983	330	6
41	21	ASMA	NO	209	339	MO	5	82	20	31	758	8	8
42	21	ASMA	NO	79	327	GRA	52	36	22	23	676	55	8
43	18	ASMA	NO	263	250	GRA	58	22	15	33	2577	115	10
44	18	ASMA	NO	189	327	GRA	100	29	17	28	825	10	10
45	22	ASMA	NO	103	42	MO	18	34	13	39	No re	32	10
46	20	ASMA	NO	103	311	GRA	58	35	62	110	No re	330	10
47	23	ASMA	NO	133	65	MO	32	9	15	45	562	225	13
48	27	ASMA	NO	240	316	GRA	47	11	3	16	311	70	22
49	20	ASMA	NO	193	218	GRA	66	15	26	34	1487	65	13
50	26	ASMA	NO	163	155	MO	38	23	36	76	1325	60	20
51	19	ASMA	NO	183	593	GRA	85	13	52	84	1464	5	10
52	20	ASMA	NO	243	540	MO	6	45	36	42	745	10	12
53	21	ASMA	NO	56	775	GRA	78	12	11	29	793	70	10
54	21	ASMA	NO	119	142	MO	28	22	32	36	816	299	5
55	20	ASMA	NO	246	508	GRA	100	20	35	68	1346	70	3
56	18	ASMA	NO	169	558	GRA	82	47	23	31	1124	6	2
57	23	ASMA	NO	280	95	MO	43	44	26	39	1894	45	7
58	18	ASMA	NO	253	130	MO	9	45	22	79	995	82	4
59	23	ASMA	NO	103	107	LEV	2	No re	11	35	No re	82	15
60	20	ASMA	NO	196	219	GRA	67	43	5	13	No re	34	7
61	22	ASMA	NO	206	116	MO	28	21	32	61	2000	299	10
62	18	ASMA	NO	383	107	GRA	52	21	92	110	2000	299	10
63	20	ASMA	NO	186	341	GRA	63	37	33	49	2000	20	12
64	17	RINITIS	SI	156	114	GRA	53	30	9	18	490	330	10
65	18	RINITIS	SI	199	611	GRA	100	24	22	37	1081	25	6
66	22	RINITIS	SI	303	787	GRA	100	70	35	35	No re	330	16
67	21	RINITIS	SI	153	72	GRA	57	15	13	19	606	330	10
68	19	RINITIS	SI	90	113	MO	16	22	27	37	1078	330	3
69	23	RINITIS	SI	290	545	GRA	93	32	20	36	706	330	10
70	20	RINITIS	SI	223	687	GRA	100	29	73	82	645	225	10
71	20	RINITIS	NO	189	285	GRA	70	25	24	54	1480	330	12
72	18	RINITIS	NO	253	112	GRA	73	61	39	53	676	330	8
73	18	RINITIS	NO	189	470	GRA	100	39	13	21	631	330	6
74	17	RINITIS	NO	63	271	GRA	75	21	6	24	386	330	8

	inmunote	meta_sav	tto_it	polen	hista	fev1	fev1_por	fvc	fvc_por	pef	pef_por
38	si	Moderada	4	16	6	4,56	120	5,41	119	9,36	123
39	si	Severa	4	10	5	4,84	107	6,00	113	10,4	103
40	si	Negativa	4	13	4	5,00	116	5,18	102	11,5	117
41	si	Severa	3	6	6	5,52	112	6,41	109	13,1	123
42	si	Moderada	2	11	5	4,92	113	5,77	114	9,97	101
43	si	Moderada	4	17	5	5,32	105	5,69	102	8,92	85
44	si	Severa	3	13	5	4,84	118	6,63	13	8,16	100
45	si	Severa	5	13	5	3,92	87	4,34	82	10,9	109
46	si	Negativa	4	14	9	4,80	102	6,22	112	11,8	114
47	si	Leve	8	15	8	4,28	97	5,13	99	9,56	96
48	si	Moderada	15	13	7	4,64	102	5,32	98	9,36	92
49	si	Moderada	1	13	5	4,28	94	4,99	94	11,4	112
50	si	Moderada	10	7	4	4,60	110	5,17	104	10,9	113
51	si	Severa	8	15	6	3,38	82	3,93	82	8,37	87
52	si	Severa	4	12	5	3,88	84	5,06	87	7,92	83
53	si	Moderada	1	14	5	4,76	105	5,64	105	10,0	98
54	si	Leve	4	10	7	4,08	99	4,13	86	8,24	86
55	si	Moderada	2	14	9	4,08	84	5,38	93	9,61	90
56	no	Severa	0	9	4	4,72	140	4,73	116	11,4	164
57	no	Severa	0	7	5	4,88	109	5,38	101	11,0	109
58	no	Moderada	0	12	7	4,20	102	5,44	110	8,57	105
59	no	Moderada	0	11	7	5,56	127	6,35	124	12,4	125
60	no	Severa	0	16	8	5,96	123	6,86	119	13,6	128
61	no	Leve	0	7	5	4,16	101	4,40	91	11,8	124
62	no	Leve	0	10	9	3,44	104	4,26	106	7,10	104
63	no	Severa	0	14	8	3,96	84	5,44	93	9,73	91
64	si	Negativa	2	15	5	4,48	137	4,85	123	11,6	172
65	si	Severa	2	12	4	4,40	107	4,78	97	9,65	118
66	si	Negativa	10	15	5	5,12	128	5,95	128	9,37	100
67	si	Negativa	5	24	9	5,52	121	6,75	126	12,5	123
68	si	Negativa	2	12	5	4,08	97	5,00	102	8,29	85
69	si	Negativa	2	9	6	4,48	107	4,59	93	10,9	113
70	si	Leve	2	12	6	4,84	106	5,42	100	9,31	91
71	si	Negativa	6	12	7	6,44	127	7,44	124	14,4	132
72	si	Negativa	4	9	3	5,08	114	5,13	96	13,4	154
73	si	Negativa	2	14	6	5,04	125	5,93	122	8,27	103
74	si	Negativa	4	9	4	4,28	127	4,42	109	8,92	129

	tiffenea	tiff_por
38	84,4	100
39	80,7	96
40	96,6	117
41	86,2	103
42	85,3	102
43	82,0	100
44	73,0	86
45	90,0	109
46	77,0	92
47	83,4	100
48	87,3	106
49	85,7	103
50	89,0	108
51	83,4	99
52	80,0	92
53	84,5	101
54	99,0	118
55	75,8	90
56	100	118
57	90,7	109
58	77,0	91
59	87,5	105
60	87,0	104
61	94,5	113
62	80,8	96
63	74,0	85
64	92,3	109
65	92,1	109
66	86,0	103
67	81,8	98
68	81,6	97
69	97,7	118
70	89,4	107
71	86,5	103
72	99,0	117
73	85,0	101
74	96,0	115

	edad	diagnos	tabaco	eosinoa	iget	igee	igee	hialur	ecp	epx	mpo	metacol	tiempo
75	18	RINITIS	NO	370	54	MO	26	28	57	34	No re	330	6
76	19	RINITIS	NO	100	92	MO	33	44	19	30	2033	330	5
77	19	RINITIS	NO	139	45	MO	6	39	10	20	No re	330	4
78	19	RINITIS	NO	140	421	MO	46	0	35	38	200	330	11
79	19	RINITIS	NO	133	172	MO	26	24	14	18	1184	299	15
80	20	RINITIS	NO	213	231	MO	47	20	64	75	660	330	15
81	19	RINITIS	NO	123	175	MO	32	25	43	74	2000	60	14
82	19	RINITIS	NO	223	247	MO	35	13	27	39	2000	330	11
83	24	RINITIS	NO	56	81	MO	12	23	21	18	2000	330	3
84	20	RINITIS	NO	216	104	GRA	100	12	38	70	2000	330	13
85	19	RINITIS	NO	220	163	MO	26	17	23	27	913	330	4
86	19	RINITIS	SI	136	305	MO	31	57	11	44	888	225	9
87	19	RINITIS	NO	166	389	GRA	88	34	11	15	897	330	2
88	18	RINITIS	NO	210	581	GRA	52	243	28	46	2210	330	3
89	25	RINITIS	NO	126	76	MO	17	43	3	17	No re	330	12
90	21	RINITIS	NO	69	414	MO	35	16	11	14	978	330	12
91	24	RINITIS	NO	133	116	MO	18	20	6	15	659	330	10
92	20	RINITIS	NO	136	406	LEV	20	13	20	32	1071	330	10

	inmunote	meta_sev	tto_it	polen	hista	fev1	fev1_por	fvc	fvc_por	pef	pef_por
75	si	Negativa	3	8	7	4,60	112	4,95	100	11,1	136
76	si	Negativa	4	15	6	4,68	96	5,35	93	10,3	96
77	si	Negativa	3	7	5	5,12	104	5,74	99	7,43	70
78	si	Negativa	6	18	7	4,80	103	4,92	90	9,01	87
79	si	Leve	4	11	4	4,20	100	4,46	92	11,9	123
80	si	Negativa	4	15	7	4,56	97	5,36	96	10,8	104
81	si	Moderada	2	10	8	4,56	101	4,75	90	9,23	91
82	si	Negativa	8	13	5	3,88	87	4,65	89	7,59	75
83	si	Negativa	2	9	4	5,52	125	6,49	124	11,3	114
84	si	Negativa	10	9	7	4,68	113	4,78	99	15,2	158
85	si	Negativa	2	12	16	3,64	82	3,99	80	7,91	83
86	no	Leve	0	10	6	4,12	94	4,49	89	8,93	90
87	no	Negativa	0	7	5	4,12	100	4,91	103	7,04	73
88	no	Negativa	0	13	7	4,80	133	5,00	115	10,1	138
89	no	Negativa	0	11	8	5,20	119	5,64	109	14,1	143
90	no	Negativa	0	7	4	5,48	108	6,19	102	11,3	103
91	no	Negativa	0	6	5	4,08	84	4,52	78	10,3	98
92	no	Negativa	0	8	4	3,64	86	4,26	87	6,95	80

	tiffenea	tiff_por
75	92,9	110
76	87,5	104
77	89,0	106
78	97,6	117
79	94,1	112
80	85,0	102
81	96,0	115
82	83,4	99
83	85,0	103
84	97,9	117
85	95,0	112
86	91,8	110
87	84,0	100
88	95,9	114
89	92,3	112
90	88,6	106
91	90,0	109
92	85,4	102

#### 4.1. Distribución de frecuencias por diagnósticos.

GRUPO	Nº DE CASOS	%
Rinitis	29	31,5
Asma	51	55,4
Control	12	13,0
Total	92	100

TABLA VI. Número de casos por grupos diagnósticos.

#### 4.2. Distribución de frecuencias por consumo de tabaco.

GRUPO	FUMADORES	NO FUMADORES	TOTAL
Rinitis	9	20	29
Asma	18	33	51
Control	0	12	12
Total	27	65	92

TABLA VII. Número de fumadores por grupos diagnósticos.

#### 4.3. Ig E específica frente a *Lolium perenne*.

La distribución de frecuencias, en función del grado de positividad de la Ig E específica se refleja en la TABLA VIII:

Ig E ESPECIFICA	FRECUENCIAS	%
Negativa	12	13,0
Positiva débil	6	6,5
Positiva	33	35,9
Muy positiva	41	44,6
Total	92	100

TABLA VIII: Distribución de frecuencias según el grado de positividad de Ig E específica.

La distribución de frecuencias de las distintas clases de Ig E específica por grupos diagnósticos fue la siguiente:

Ig E ESPECIFICA	RINITIS	ASMA	CONTROL	TOTAL
Negativa	0	0	12	12
Positiva débil	1	5	0	6
Positiva	15	18	0	33
Muy positiva	13	28	0	41
Total	29	51	12	92

TABLA IX: Ig E específica por grupos diagnósticos.



#### **4.4. Bondad de ajuste a la normal de las variables cuantitativas.**

Mediante el método de Kolmogorov-Smirnov se estudió el ajuste a la normal de las variables cuantitativas y se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en las siguientes: PCE , Ig E total y test de metacolina en el grupo asma y test de metacolina y ácido hialurónico en el grupo rinitis. En el resto de variables en los tres grupos no se encontraron diferencias significativas.

#### **4.5. Pruebas diagnósticas "in vivo".**

##### **4.5.1. Pruebas cutáneas.**

Todos los pacientes de los grupos rinitis y asma presentaron pruebas cutáneas positivas mediante prick test a *Lolium perenne* y negativas al resto de pólenes, ácaros del polvo doméstico, dérmicos de animales y hongos.

En los sujetos del grupo asma y rinitis las pápulas obtenidas con el polen de gramínea resultaron ser de mayor tamaño que las producidas con histamina en todos los casos.

En las columnas 17 y 18 de la estructura de datos se muestra el tamaño en milímetros de la pápula obtenida con *Lolium perenne* y con control positivo con histamina. Todas las pruebas cutáneas con polen efectuadas en los sujetos del grupo control resultaron negativas.

#### 4.5.2. Test de hiperreactividad bronquial (HB) inespecífica.

Todos los pacientes de los grupos asma y rinitis y los sujetos del grupo control mostraron valores absolutos de FEV1, FVC y PEF superiores al 80% del valor teórico. Los valores absolutos de estos parámetros de función respiratoria, así como sus porcentajes se reflejan en las columnas 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26 de la estructura de datos.

A continuación se muestran los resultados del test de HB en los distintos grupos diagnósticos:

GRUPO	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Rinitis	24	3	1	1
Asma	6	8	19	18
Control	12	0	0	0
Total	42	11	20	19

TABLA X: Resultados del test de HB por grupos diagnósticos.

En el grupo control el test de hiperreactividad bronquial resultó negativo en todos los casos.

En el grupo de pacientes con rinitis se demostró test de HB positivo en 5 sujetos, siendo negativo en los 24 restantes.

En el grupo de pacientes con asma la prueba de HB resultó positiva en 45 pacientes, siendo negativa en 6.

En la TABLA XI se muestran los resultados expresando la PD20 en los distintos grupos diagnósticos:

PD20 (UA)	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	302	119	330
D. típica	77	116	0
Error standard	14,3	16,3	0
Valor mínimo	25	4	330
Valor máximo	330	330	330
Rango	305	326	0
Mediana	330	70	330
Moda	330	330	330

TABLA XI. PD20 en grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas entre pacientes con asma y grupo control ( $p < 0,001$ ) e igualmente entre pacientes con asma y rinitis ( $p < 0,001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre sujetos con rinitis y grupo control.

Los sujetos fumadores presentaron mayor grado de severidad de HB (212 UA) respecto de los no fumadores (173 UA), sin llegar a existir diferencias significativas.

Los pacientes que habían recibido inmunoterapia presentaron un menor grado de severidad de HB (181 UA) frente los que no recibieron este tipo de tratamiento (204 UA), sin llegar a existir diferencias significativas.

Tampoco se observaron diferencias significativas respecto a los años de evolución de la enfermedad en los distintos grupos de HB: severa ( $8,7 \pm 2,4$  años), moderada ( $10,8 \pm 5$  años), leve ( $9,5 \pm 3,1$  años) y negativa ( $8,8 \pm 4,6$  años).

#### **4.6. Pruebas diagnósticas "in vitro".**

##### **4.6.1. Recuento de eosinófilos.**

A continuación se muestran los resultados en los tres grupos diagnósticos:

Nº Eos./ $\mu$ l	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	173	196	100
D. típica	74	110	39
Error standard	13,6	15,4	11,3
Valor mínimo	56	43	56
Valor máximo	370	576	193
Rango	314	533	137
Mediana	156	183	96
Moda	133	103	63

TABLA XII: Recuento de eosinófilos por grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas ( $p=0,004$ ) entre los sujetos con diagnóstico clínico de asma respecto del grupo control y entre sujetos con rinitis respecto del grupo control ( $p=0,003$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre sujetos con asma respecto a rinitis.

A continuación se refleja el número de eosinófilos/ $\mu$ l en función del grado de HB:

Nº Eos./ $\mu$ l	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Nº de casos	42	10	21	19
Media	145	169	193	231
D. típica	72	87	113	110
E. standard	11,1	27,4	24,5	25,3
Valor mínimo	56	66	43	103
Valor máximo	370	383	513	576
Rango	314	317	470	473
Mediana	133	141	193	196
Moda	63	133	79	189

TABLA XIII. Eosinófilos en función de la severidad de HB.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) comparando los sujetos con HB severa y aquellos sujetos con HB negativa.

No se objetivaron diferencias significativas entre los sujetos con HB severa y moderada, HB moderada y leve, HB leve y negativa, HB severa y leve ni HB moderada y negativa.

No se observaron diferencias significativas entre los sujetos fumadores (181 eosinófilos/ $\mu$ l) y los no fumadores (175 eosinófilos/ $\mu$ l).

No se observaron diferencias significativas entre los pacientes que habían recibido inmunoterapia (189 eosinófilos/ $\mu$ l) y los no tratados (183 eosinófilos/ $\mu$ l).

#### 4.6.2. Ig E total.

Las concentraciones de Ig E total en KU/l en suero de los pacientes fueron las siguientes:

IgE TOTAL (KU/l)	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	313	404	47
D. típica	251	381	45
Error standard	46,5	53,4	12,9
Valor mínimo	45	28	9
Valor máximo	1041	1689	150
Rango	996	1661	141
Mediana	247	311	26,5
Moda	45	95	19

TABLA XIV. Ig E total por grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre sujetos con diagnóstico de asma respecto de sanos y entre sujetos con rinitis y sanos ( $p < 0,001$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre sujetos con asma y rinitis.

A continuación se reflejan los valores de Ig E total en función del grado de HB.

Ig E (KU/L)	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Nº de casos	42	10	21	19
Media	212	391	480	385
D. típica	227	327	471	303
E. standard	34,9	104	103	69,4
Valor mínimo	9	65	28	42
Valor máximo	1041	1073	1689	1352
Rango	1032	1008	1661	1310
Mediana	114	247	250	339
Moda	19	65	28	95

TABLA XV. Ig E total en función del grado de HB.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre sujetos con HB positiva respecto aquellos con test de HB negativo.

No se observaron diferencias significativas entre los sujetos con HB severa y moderada, HB severa y leve y HB moderada y leve respectivamente.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre los sujetos con HB severa y negativa, HB moderada y negativa y HB leve y negativa.

Los sujetos fumadores presentaron una mayor concentración de Ig E total (408 KU/l) frente los no fumadores (175 KU/l), siendo las diferencias significativas ( $p = 0,02$ ).



No se encontraron diferencias significativas entre los sujetos que recibieron inmunoterapia (381 KU/l) respecto de los no tratados (328 KU/l).

#### 4.6.3. Ig E específica.

A continuación se observan los valores de Ig E específica frente *Lolium perenne* (KU/l) en suero de los pacientes en los tres grupos diagnósticos:

IgE esp. (KU/l)	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	51,3	58,1	0
D. típica	31,6	62,1	0
Error standard	5,8	8,7	0
Valor mínimo	6	1	0
Valor máximo	100	100	0
Rango	94	99	0
Mediana	46	46	0
Moda	100	100	0

TABLA XVI. Ig E específica por grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas entre sujetos con diagnóstico clínico de asma respecto al grupo control ( $p < 0,001$ ) y entre sujetos con rinitis respecto al grupo control ( $p < 0,001$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre los sujetos del grupo asma respecto al de rinitis.

A continuación se muestran los valores de Ig E específica en función del grado de HB.

Ig E esp.	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Nº de casos	42	10	21	19
Media	34,4	50,9	53,8	42,3
D. típica	32,8	32,9	34,9	38,3
E. standard	5	10,4	7,6	8,8
Valor mínimo	0	21	2	1
Valor máximo	100	100	100	100
Rango	100	79	98	99
Mediana	26	31,5	52	40
Moda	0	28	100	6

TABLA XVII. Ig E específica en función del grado de HB.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sujetos con HB positiva respecto de HB negativa.

No se observaron diferencias significativas entre los sujetos con HB severa y moderada, HB severa y negativa, HB moderada y leve ni entre sujetos con HB severa y leve.

Se detectaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sujetos con HB moderada y negativa.

No se observaron diferencias significativas entre sujetos fumadores (49,5 KU/l) respecto de los no fumadores (32,5 KU/l).

No se observaron diferencias significativas entre los pacientes que habían recibido inmunoterapia (50,5 KU/l) respecto de los no tratados (40,4 KU/l).

#### 4.6.4. Proteína catiónica del eosinófilo (PCE).

A continuación se observan las concentraciones de PCE en  $\mu\text{g/l}$  en el suero de los pacientes en los tres grupos diagnósticos:

PCE ( $\mu\text{g/l}$ )	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	24,9	28,3	8,6
D. típica	17,5	19,8	5,2
Error standard	3,2	2,7	1,5
Valor mínimo	3	3	2
Valor máximo	73	92	17
Rango	70	89	15
Mediana	21	24	7,5
Moda	11	11	3

TABLA XVIII. PCE por grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas entre sujetos con asma respecto al grupo control ( $p < 0,001$ ) y entre sujetos con rinitis respecto al grupo control ( $p = 0,003$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre sujetos con asma respecto de rinitis.

En la TABLA XIX se muestran los valores de PCE en los distintos grupos de pacientes en función del grado de HB.

PCE ( $\mu\text{g/l}$ )	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Nº de casos	42	10	21	19
Media	19,4	32,6	27,9	28,2
D. típica	15,5	27,8	18,8	18,5
E. standard	2,4	8,8	4,1	4,2
Valor mínimo	2	11	3	5
Valor máximo	64	92	74	76
Rango	62	81	71	71
Mediana	14,5	23	22	24
Moda	13	11	11	23

TABLA XIX. PCE en función del grado de HB.

Se objetivaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre sujetos con HB positiva respecto de HB negativa.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los sujetos con HB severa y negativa, HB moderada y negativa y HB leve y negativa.

No se objetivaron diferencias significativas entre HB severa y moderada, HB moderada y leve y HB severa y leve.

Las concentraciones de PCE fueron mayores en los sujetos fumadores ( $23 \mu\text{g/l}$ ) que en los no fumadores ( $19,5 \mu\text{g/l}$ ), sin que las diferencias llegasen a ser significativas.

Las concentraciones de PCE fueron mayores en los pacientes que recibieron inmunoterapia (28,1  $\mu\text{g/l}$ ) que en los no tratados (22,6  $\mu\text{g/l}$ ), sin llegar a ser significativas estas diferencias.

#### 4.6.5. Proteína X del eosinófilo (PXE).

Las concentraciones de PXE en  $\mu\text{g/l}$  en suero de los pacientes fueron las siguientes:

PXE ( $\mu\text{g/l}$ )	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	35,9	45,3	21,4
D. típica	19,6	26,2	10,9
Error standard	3,6	3,7	3,1
Valor mínimo	14	13	10
Valor máximo	82	121	47
Rango	68	108	37
Mediana	34	35	18
Moda	18	31	15

TABLA XX. PXE por grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas entre sujetos del grupo asma respecto del grupo control ( $p < 0,001$ ) y entre sujetos con rinitis y el grupo control ( $p < 0,005$ ).

No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,1$ ) entre sujetos con asma respecto rinitis.

En la TABLA XXI se muestran los resultados de PXE en función del grado de severidad de HB:

PXE ( $\mu\text{g/l}$ )	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Nº de casos	42	10	21	19
Media	31,4	50,3	45,6	43,4
D. típica	19,9	28,4	23,9	26,3
E. standard	3	8,9	5,2	6
Valor mínimo	10	18	16	13
Valor máximo	110	110	100	121
Rango	100	92	84	108
Mediana	24,5	44,5	35	39
Moda	15	18	23	31

TABLA XXI. PXE en función del grado de HB.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre sujetos con HB positiva respecto de HB negativa.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sujetos con HB severa y negativa e igualmente significativas ( $p < 0,01$ ) entre sujetos con HB moderada y negativa y HB leve y negativa.

No se observaron diferencias significativas entre sujetos con HB severa y moderada, HB moderada y leve y HB severa y leve.

No se observaron diferencias significativas entre los fumadores ( $39 \mu\text{g/l}$ ) y los no fumadores ( $32,5 \mu\text{g/l}$ ) ni entre

los que recibieron inmunoterapia (42,3  $\mu\text{g/l}$ ) y los que no la recibieron (40  $\mu\text{g/l}$ ).

#### 4.6.6. Mieloperoxidasa (MPO).

A continuación se observan las concentraciones de MPO expresadas en  $\mu\text{g/l}$  en suero de los pacientes:

MPO ( $\mu\text{g/l}$ )	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	1099	1329	522
D. típica	603	902	219
Error standard	121	135	63
Valor mínimo	200	311	305
Valor máximo	2210	5817	906
Rango	2010	5506	605
Mediana	913	1028	437
Moda	2000	2000	301

TABLA XXII. MPO por grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los sujetos con asma respecto al grupo control y entre sujetos con rinitis respecto del grupo control ( $p < 0,001$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre sujetos con asma y rinitis.

En la TABLA XXIII se muestran los valores de MPO en función del grado de severidad de HB:

MPO ( $\mu\text{g/l}$ )	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Nº de casos	42	10	21	19
Media	853	1212	1281	1595
D. típica	549	572	601	1271
E. standard	90,2	181	137,9	318
Valor mínimo	200	562	311	574
Valor máximo	2210	2000	2577	5817
Rango	2010	1438	2266	5243
Mediana	674	1013	1161	1138
Moda	2000	2000	2000	574

TABLA XXIII. MPO en función del grado de HB.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre sujetos con test de HB positivo respecto de HB negativo.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre sujetos con HB severa y negativa y HB moderada y negativa, e igualmente significativas ( $p < 0,05$ ) entre sujetos con HB leve y negativa.

No se observaron diferencias significativas entre sujetos con HB severa y moderada, HB moderada y leve ni HB severa y leve.

No se observaron diferencias significativas entre los sujetos fumadores ( $1135 \mu\text{g/l}$ ) y los no fumadores ( $1143 \mu\text{g/l}$ ), ni entre los que recibieron inmunoterapia ( $1216 \mu\text{g/l}$ ) y los que no la recibieron ( $1393 \mu\text{g/l}$ ).



#### 4.6.7. Acido hialurónico (AH).

Las concentraciones de AH, expresadas en  $\mu\text{g/l}$ , en suero de los pacientes fueron las siguientes:

AH ( $\mu\text{g/l}$ )	RINITIS	ASMA	CONTROL
Número de casos	29	51	12
Media	35,8	34,8	16
D. típica	42,7	17,8	15,7
Error standard	7,9	2,5	4,5
Valor mínimo	0	9	0
Valor máximo	243	100	50
Rango	243	91	50
Mediana	25	33	10,5
Moda	13	29	0

TABLA XXIV. Acido hialurónico por grupos diagnósticos.

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre sujetos con asma respecto del grupo control y entre sujetos con rinitis respecto del grupo control ( $p = 0,03$ ).

No se encontraron diferencias significativas entre sujetos con asma respecto rinitis.

En la TABLA XXV se muestran los valores de ácido hialurónico en función del grado de severidad de HB.

AH ( $\mu\text{g/l}$ )	HB negativa	HB leve	HB moderada	HB severa
Nº de casos	42	10	21	19
Media	30,2	34,5	30,1	39,7
D. típica	37,2	26,1	14,9	15,8
E. standard	5,7	8,2	3,3	3,6
Valor mínimo	0	9	11	13
Valor máximo	243	100	76	82
Rango	243	91	65	69
Mediana	24	26,5	29	40
Moda	33	21	29	34

TABLA XXV. AH en función del grado de HB.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sujetos con HB positiva respecto de HB negativa.

Se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sujetos con HB severa respecto HB moderada, HB severa y leve, e igualmente significativas ( $p < 0,001$ ) entre HB severa y negativa.

No se observaron diferencias significativas entre HB moderada y leve, HB moderada y negativa y HB leve y negativa.

No se observaron diferencias entre los fumadores ( $31 \mu\text{g/l}$ ) y los no fumadores ( $25 \mu\text{g/l}$ ), ni entre los que recibieron inmunoterapia ( $32,2 \mu\text{g/l}$ ) y los que no la recibieron ( $48,8 \mu\text{g/l}$ ).

#### 4.6.8. Triptasa.

Los valores de triptasa sérica fueron indetectables en todas las muestras estudiadas de todos los grupos diagnósticos.

#### 4.7. Estudio de sensibilidad y especificidad.

##### 4.7.1. PCE.

PCE ( $\mu\text{g/l}$ )	Test HB +		Test HB -		S %	E %	VPP %	VPN %
	+	-	+	-				
10	47	3	30	12	94	28	61	80
20	32	18	17	25	64	59	65	58
30	19	31	8	34	38	80	70	52
40	9	41	3	39	18	92	75	48
50	7	43	3	39	14	93	70	48
60	6	44	2	40	12	95	75	48
70	5	45	0	42	10	100	100	48
80	1	49	0	42	2	100	100	42
90	1	49	0	42	2	100	100	42
100	0	50	0	42	0	100	100	45

En la primera columna se refleja la PCE ( $\mu\text{g/l}$ ), obtenida en los sujetos con test de HB positivo (2ª y 3ª columna) frente a los sujetos con test de HB negativo (4ª y 5ª columna). La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se observan en la 6ª, 7ª, 8ª y 9ª columna respectivamente.

En la siguiente figura se observa la curva característica operador receptor:

# PCE

## Metacolina positiva *versus* negativa

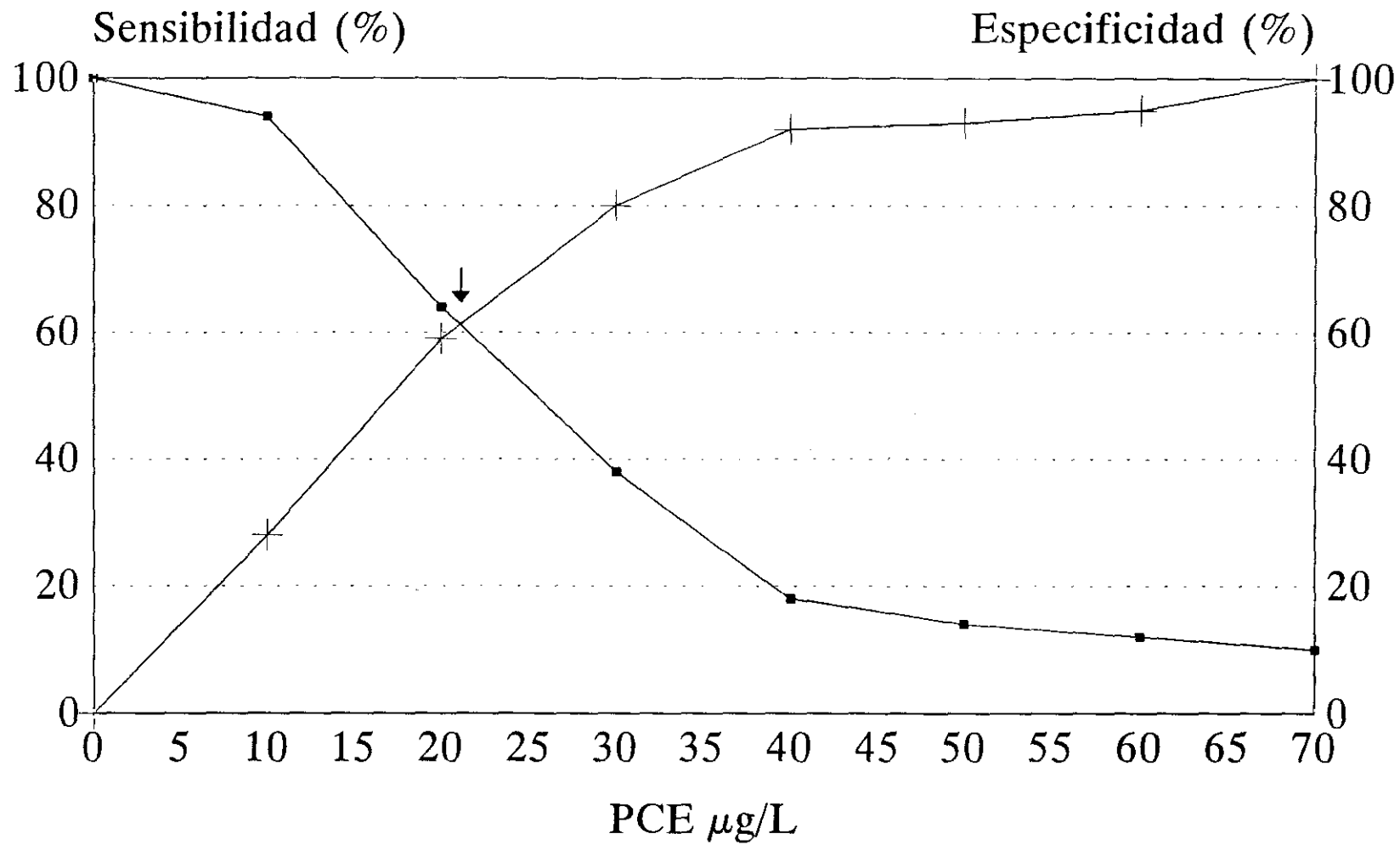


Figura 1

#### 4.7.2. PXE.

PXE	Test HB +		Test HB -		S	E	VPP	VPN
( $\mu\text{g/l}$ )	+	-	+	-	%	%	%	%
10	52	0	42	0	100	0	55	0
20	47	5	37	15	90	28	55	75
30	37	15	19	23	71	54	66	60
40	25	27	8	34	48	81	76	56
50	19	33	6	36	36	86	76	52
60	14	38	4	38	26	90	78	50
70	13	39	1	41	25	97	92	51
80	8	44	1	41	15	98	88	48
90	5	47	1	41	10	98	83	47
100	5	47	1	41	10	98	83	47
110	4	48	1	41	8	98	80	46
120	3	49	0	42	5	100	0	46
130	0	52	0	42	0	100	0	44

En la primera columna se refleja la concentración de PXE ( $\mu\text{g/l}$ ) obtenida en los sujetos con test de HB positiva (2ª y 3ª columna) frente los sujetos con test de HB negativo. La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se observan en la 6ª, 7ª, 8ª y 9ª columna respectivamente.

En la siguiente figura se muestra la curva característica operador receptor:

# PXE

## Metacolina positiva *versus* negativa

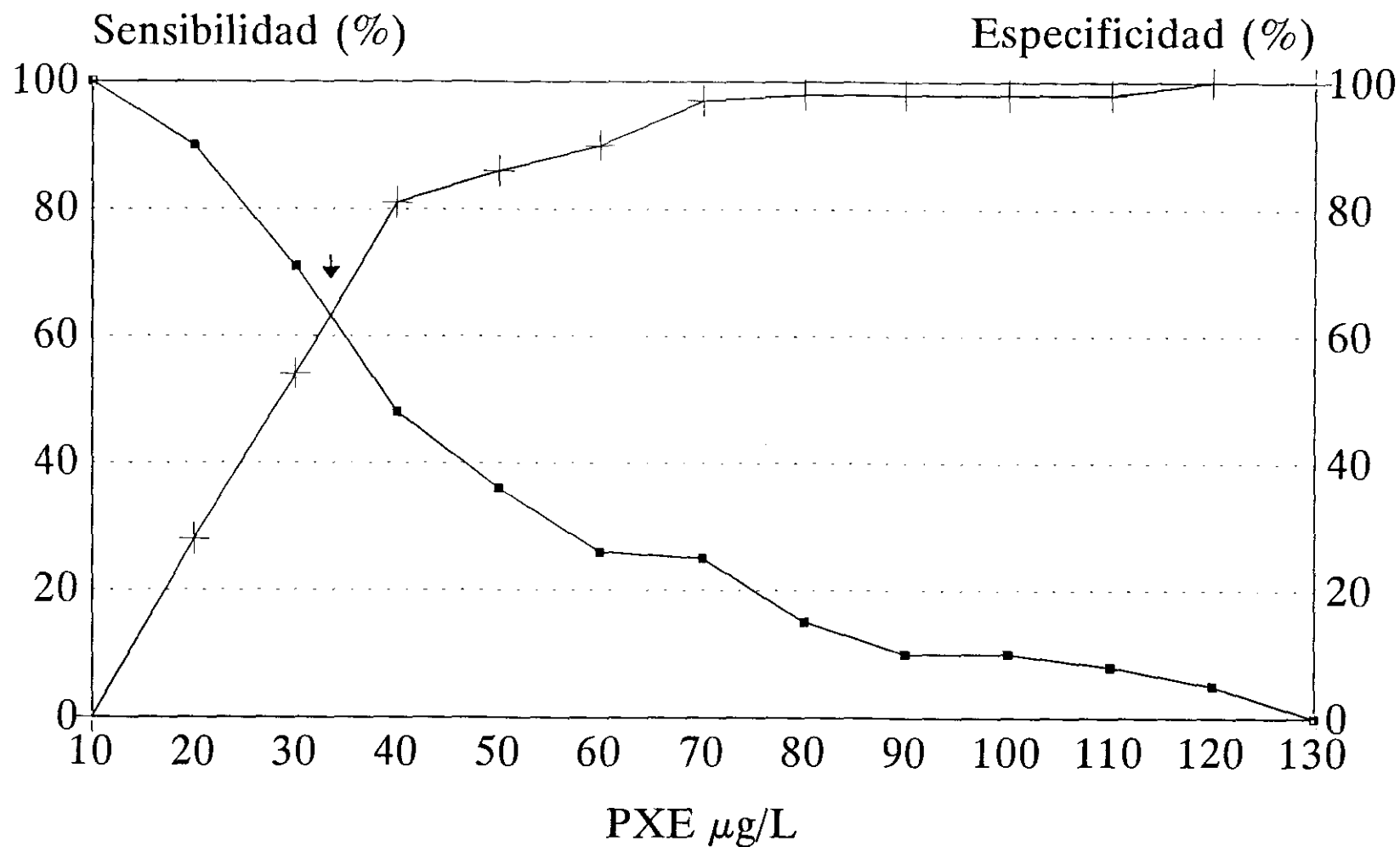


Figura 2

#### 4.7.3. MPO.

MPO ( $\mu\text{g/l}$ )	Test HB +		Test HB -		S	E	VPP	VPN
	+	-	+	-	%	%	%	%
500	45	1	26	12	98	31	63	92
1000	28	18	9	29	61	76	75	61
1500	15	31	6	32	32	84	71	50
2000	13	33	6	32	28	84	68	49
2500	4	42	1	37	8	97	80	46
3000	1	45	0	38	8	97	80	46
3500	1	45	0	38	8	97	80	46
4000	1	45	0	38	8	97	80	46
4500	1	45	0	38	8	97	80	46
5000	1	45	0	38	8	97	80	46
5500	1	45	0	38	8	97	80	46
6000	0	46	0	38	0	100	0	45

En 1ª columna se refleja la concentración de MPO ( $\mu\text{g/l}$ ) obtenida en los sujetos con HB positiva (2ª y 3ª columna) frente los sujetos con HB negativa (4ª y 5ª columna). La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se observan en la 6ª, 7ª, 8ª y 9ª columna respectivamente.

En la siguiente figura se muestra la curva característica operador receptor.

# MPO

## Metacolina positiva *versus* negativa

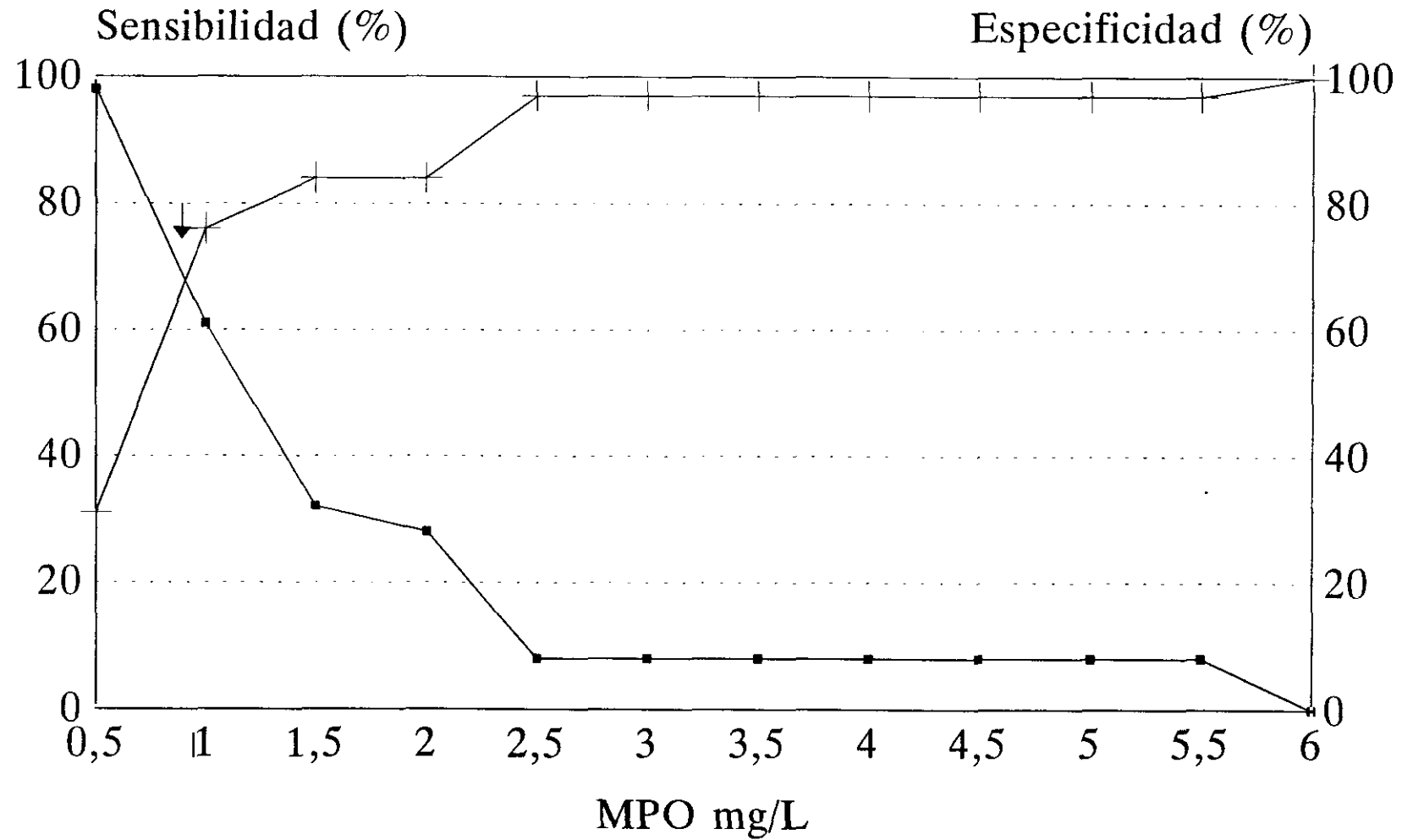


Figura 3



#### 4.7.4. AH.

AH ( $\mu\text{g/l}$ )	Test HB+		Test HB-		S %	E %	VPP %	VPN %
	+	-	+	-				
25	34	16	20	22	68	52	63	58
50	7	43	4	38	14	90	63	47
75	4	46	1	41	8	97	80	47
100	2	48	1	41	4	97	66	46
125	1	49	1	41	2	97	50	45
150	1	49	1	41	2	97	50	45
175	1	49	1	41	2	97	50	45
200	1	49	1	41	2	97	50	45
225	1	49	1	41	2	97	50	45
250	0	50	0	42	0	100	0	45

En la 1ª columna se refleja la concentración de AH ( $\mu\text{g/l}$ ) obtenida en los sujetos con test de HB positivo (2ª y 3ª columna) frente los sujetos con test de HB negativo (4ª y 5ª columna). La sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) se muestran en las columnas 6ª, 7ª, 8ª y 9ª respectivamente.

En la siguiente figura se muestra la curva característica operador receptor:

# ACIDO HIALURONICO

Metacolina positiva *versus* negativa

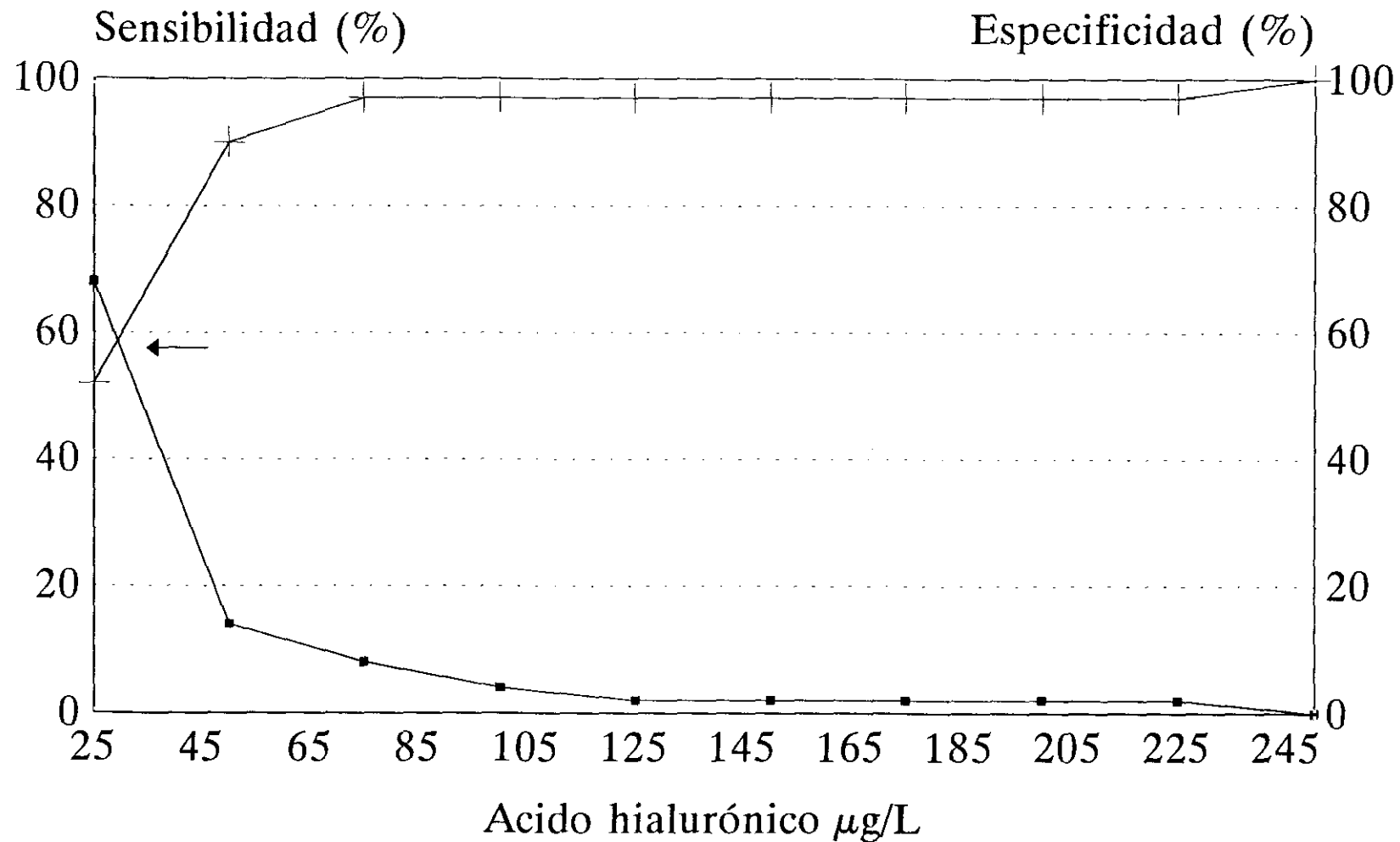


Figura 4

#### **4.8. Estudio de correlación.**

##### **4.8.1. PCE y eosinófilos.**

Se observó un escaso nivel de correlación ( $r=0,42$ ) entre las concentraciones de PCE y el número de eosinófilos en sangre periférica ( $p<0,001$ ).

##### **4.8.2. PCE e Ig E total y específica.**

Se objetivó un escaso nivel de correlación ( $r=0,51$  y  $r=0,31$ ) entre las concentraciones de PCE e Ig E total y específica en suero ( $p<0,001$ ).

##### **4.8.3. PCE y test de HB.**

Se observó un escaso nivel de correlación inversa ( $r=-0,28$ ) entre las concentraciones de PCE y test de HB ( $p<0,06$ ).

##### **4.8.4. PXE y eosinófilos.**

Se objetivó un escaso nivel de correlación ( $r=0,38$ ) entre las concentraciones de PXE y el número de eosinófilos en sangre periférica ( $p<0,001$ ).

##### **4.8.5. PXE e Ig E total y específica.**

Se observó un escaso nivel de correlación ( $r=0,38$  y

$r=0,22$ ) entre las concentraciones de PXE e Ig E total y específica en suero ( $p<0,001$  y  $p<0,05$ ).

#### **4.8.6. PXE y test de HB.**

Se observó un escaso nivel de correlación inversa ( $r=-0,30$ ) entre las concentraciones de PXE y el test de HB ( $p<0,003$ ).

#### **4.8.7. MPO y test de HB.**

Se observó un escaso nivel de correlación inversa ( $r=-0,38$ ) entre las concentraciones de MPO y el test de HB ( $p<0,001$ ).

#### **4.8.8. AH y test de HB.**

Se observó un escaso nivel de correlación inversa ( $r=-0,30$ ) entre las concentraciones de ácido hialurónico y el test de HB ( $p<0,004$ ).

#### **4.8.9. PCE y PXE.**

Se encontró un fuerte nivel de correlación ( $r=0,80$ ) entre las concentraciones de PCE y PXE ( $p<0,001$ ).

#### **4.8.10. Edad y marcadores.**

No se encontraron correlaciones significativas entre la edad en años y los diferentes marcadores de inflamación,

ni con la prueba de HB.

#### **4.8.11. Años de evolución.**

No se encontraron correlaciones significativas entre los años de evolución de la enfermedad y los distintos marcadores de inflamación, ni con la prueba de HB.

## **5.DISCUSION**

Hemos realizado un estudio de diferentes marcadores de inflamación en el suero de pacientes diagnosticados de asma bronquial y/o rinitis alérgica polínicos en relación con un grupo de individuos sanos de edad y sexo similar. Nuestro objetivo ha sido estudiar cinco marcadores de activación proinflamatoria: proteína catiónica y proteína X del eosinófilo, mieloperoxidasa, triptasa y ácido hialurónico, en el suero de estos pacientes durante la época extraestacional y estudiar la relación con el grado de hiperreactividad bronquial.

A continuación se valoran y discuten los resultados obtenidos, comparándolos con los hallados en la literatura.

#### **5.1. Pruebas cutáneas, Ig E total e Ig E específica.**

Las pruebas cutáneas son el test "in vivo" más rápido, sencillo y eficaz para el diagnóstico de las enfermedades alérgicas, incluidas la rinitis y el asma bronquial (120,126).

Todos los pacientes de los grupos asma y rinitis presentaron pruebas cutáneas positivas frente a los pólenes de gramíneas en lectura inmediata. La positividad en la lectura implicó la aparición de una pápula superior a la producida por histamina. La negatividad de las pruebas cutáneas frente el resto de neumoaergenos , resto de pólenes, ácaros, hongos y dérmicos, indica la no sensibilización de los mastocitos cutáneos a dichos

aeroalergenos.

La reacción inmediata de la prueba cutánea se debe a la activación de los mastocitos cutáneos que liberan histamina, PGD<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub> y LTB<sub>4</sub> (127). Este resultado indica la sensibilización de los mastocitos frente a los pólenes de gramíneas.

La Ig E total es, en ausencia de enfermedad parasitaria o inmunodeficiencia, un marcador inespecífico de enfermedad alérgica (128). Las concentraciones séricas de Ig E total en nuestros pacientes de los grupos rinitis (247 KU/l) y asma (311 KU/l) fueron significativamente superiores respecto del grupo control (26,5 KU/l), cuyos valores estaban dentro del rango de la normalidad (129).

No observamos diferencias significativas en las concentraciones de Ig E total entre los sujetos con asma respecto del grupo de rinitis, ni entre los diferentes grupos de hiperreactividad bronquial positiva.

La Ig E específica frente a *Lolium perenne* es un marcador específico de la sensibilización de los sujetos a este polen de gramínea (130). Los niveles séricos de Ig E específica frente este polen fueron positivos en los grupos de rinitis (46 KU/l) y asma (46 KU/l) respecto del grupo control que siempre resultó negativa (clase 0, < 0,35 KU/l).

No encontramos diferencias significativas entre los sujetos con asma respecto del grupo rinitis, ni entre los



diferentes grupos de hiperreactividad bronquial positiva.

Basándonos en la historia clínica y los resultados obtenidos mediante las pruebas cutáneas, Ig E total y específica realizamos el diagnóstico etiológico de certeza de la rinitis y/o asma bronquial. Sin embargo, es difícil establecer la severidad de la afectación bronquial, pues la Ig E y los test cutáneos no discriminan entre los distintos grupos ni entre los sujetos con o sin HB.

## **5.2. Recuento de eosinófilos**

El eosinófilo es una célula proinflamatoria relevante en la fisiopatología de la rinitis y del asma bronquial. Pueden estudiarse en sangre periférica (24), LBA (33), esputo (35) y secreción nasal (48) de los pacientes con asma y rinitis.

El número absoluto de eosinófilos en sangre periférica efectuado en los tres grupos: rinitis (173 eosinófilos/ $\mu$ l), asma (196 eosinófilos/ $\mu$ l) y grupo control (100 eosinófilos/ $\mu$ l), demostró diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre los sujetos alérgicos y los no alérgicos, pero no se observaron diferencias significativas entre los pacientes del grupo rinitis respecto del grupo asma.

En relación con las cifras consideradas como normales en población adulta, 125 eosinófilos/ $\mu$ l con un rango entre 50 y 300 (25), los resultados obtenidos en nuestros sujetos de todos los grupos se encuentran dentro del rango de

referencia.

Valorando el recuento de eosinófilos en función del grado de severidad de la HBI: negativa (145 eosinófilos/ $\mu$ l), leve (169 eosinófilos/ $\mu$ l), moderada (193 eosinófilos/ $\mu$ l) y severa (231 eosinófilos/ $\mu$ l), únicamente se encontraron diferencias ( $p < 0,005$ ) entre los sujetos que presentaban HB severa y los que no presentaban HB.

Estas diferencias existentes entre los sujetos alérgicos y los no alérgicos y los que presentan HB severa respecto de los que presentan HB negativa sugieren la participación del eosinófilo en estas patologías.

### **5.3. Proteína catiónica (PCE) y proteína X (PXE) del eosinófilo.**

Los mediadores del eosinófilo juegan un papel básico en la patogénesis de la inflamación bronquial responsable de la hiperreactividad característica del asma (6). No disponemos todavía de métodos sencillos rutinarios para estudiar la participación de esta importante célula proinflamatoria. En los últimos años se están evaluando los productos derivados del interior de los gránulos intracitoplasmáticos (PCE, PXE, PBM, EPO) en diversos fluidos: suero, LBA y esputo (58,59,60).

Hemos estudiado las concentraciones séricas de la PCE y de PXE de sujetos polínicos, diagnosticados de rinitis y/o asma, y de sujetos sanos durante la época

extraestacional. Es importante resaltar que todos los pacientes estaban asintomáticos en el momento del estudio, además no realizaban ningún tipo de tratamiento médico y llevaban una vida rigurosamente normal.

La PCE y la PXE son dos proteínas intracitoplasmáticas y su detección en suero indica liberación al exterior por parte del eosinófilo en fase de activación (52). En la actualidad se atribuye a estas proteínas las lesiones del epitelio respiratorio que se observan en los pacientes asmáticos (57). El proceso de degranulación del eosinófilo puede favorecerse artificialmente añadiendo IL-5 o partículas de Sephadex opsonizadas a los eosinófilos aislados. En nuestro trabajo la liberación fue espontánea, sin utilizar ningún tipo de sustancia estimulante como las anteriormente citadas.

Ahlstedt y cols. (61) han estudiado los niveles séricos en adultos sanos de PCE, 6,0  $\mu\text{g/l}$  con un rango 2,3-15,9, y PXE, 17,7  $\mu\text{g/l}$  con un rango 8,2-38,5. También estudiaron el aclaramiento de estas proteínas, siendo para PCE alrededor de 65 minutos y 103 minutos para la PXE.

Destacamos la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en nuestros resultados entre los pacientes de los grupos rinitis (21  $\mu\text{g/l}$ ) y asma (24  $\mu\text{g/l}$ ) respecto de los sujetos no alérgicos del grupo control (7,5  $\mu\text{g/l}$ ). Los pacientes asmáticos presentaban niveles séricos superiores a los del grupo de rinitis, sin llegar a ser significativas las diferencias.

Respecto de los resultados de PXE encontramos resultados similares. Los pacientes del grupo rinitis (35,9  $\mu\text{g/l}$ ) y asma (45,3  $\mu\text{g/l}$ ) presentaban niveles significativamente superiores a los sujetos del grupo control (21,4  $\mu\text{g/l}$ ). Las diferencias existentes entre rinitis y asma no llegaron a ser significativas. Los resultados que hemos obtenido en los sujetos del grupo control se ajustan a los obtenidos por Ahlstedt (55).

La elevación de los niveles de PCE y PXE ha sido descrita en pacientes con asma bronquial y rinitis alérgica, y también en otras enfermedades en las que el eosinófilo juega un papel básico en la patogénesis como son algunas autoinmunes (131,132,133) y las parasitarias (134,135,136,137). Además de la rinitis y el asma bronquial, también se ha descrito aumento de estas proteínas en otras enfermedades alérgicas, como son la dermatitis atópica (138) y la dermatitis de contacto (139). Es importante resaltar que ninguno de los sujetos estudiados presentaba anamnesis de enfermedad que cursase con inflamación en los últimos 3 meses, ni referían datos sugestivos de las enfermedades citadas anteriormente.

Existen diferentes trabajos que han estudiado las variaciones de las concentraciones de PCE en suero en función de la exposición al pólen durante la época estacional (140). Durante la época en que realizamos el estudio, desde octubre de 1992 hasta febrero de 1993, en Madrid no existen recuentos significativos de pólenes atmosféricos y menos aún de pólenes de gramíneas, cuya

época de polinización está muy restringida al período entre el 15 de mayo y el 15 de junio (117). Este dato tiene importancia pues en el asma alérgico por sensibilización a pólenes los agentes desencadenantes son evidentemente los pólenes (15), y en nuestros sujetos en particular los de gramíneas son los responsables de la aparición de la sintomatología nasal y torácica.

Existen trabajos realizados en asmáticos sensibilizados a otros neumoaergenos, así Dahl y cols. (47) estudiaron los niveles de PCE en suero de asmáticos durante pruebas de provocación con *Dermatophagoides pteronyssinus* comprobando una buena correlación entre los recuentos de eosinófilos, las concentraciones de PCE y los parámetros de función respiratoria, atribuyendo al eosinófilo una participación activa en la inflamación alérgica.

La PCE y la PXE han sido cuantificadas en otros fluidos biológicos además del suero. En la actualidad se realiza fibrobroncoscopia y LBA en pacientes asmáticos con una elevada rentabilidad y sin efectos secundarios llamativos. Bousquet y cols. (141) han estudiado los niveles de PCE en LBA de asmáticos, atópicos y no atópicos, observando una evidente correlación entre el grado de severidad del asma y las concentraciones de este marcador. Además se ha demostrado una buena correlación entre los niveles de PCE y triptasa e igualmente entre PCE y ácido hialurónico. Es interesante resaltar la buena correlación existente entre los niveles de PCE en suero y LBA

(59,60,61).

Carlson y cols. (142) estudiaron "in vitro" la respuesta de granulocitos a partículas de Sephadex opsonizadas en pacientes polínicos antes y durante la época de polinización, encontrando una mayor tendencia a liberar PCE y PXE por parte de estas células durante la época de polinización. En nuestro trabajo la liberación de mediadores eosinofílicos se realizó de forma espontánea, sin añadir partículas de Sephadex ni IL-5.

Griffin y cols. (32) estudiaron los niveles de PCE en el suero de pacientes con asma severo y midieron la capacidad funcional respiratoria estudiando el PEF, encontrando una correlación significativa entre ambos parámetros. En estos sujetos al realizar el tratamiento adecuado se producía una mejoría de PEF acompañada de un descenso de los niveles de PCE.

Venge y cols. (143) han demostrado la excelente correlación existente entre la PCE en suero y los test de función respiratoria, incluyendo test de hiperreactividad bronquial no específica, en sujetos diagnosticados de asma inducido por ejercicio.

Posiblemente la correlación obtenida en nuestros resultados no es tan elevada como la descrita por los autores anteriormente citados por la época en la que realizamos el estudio, cuando los pacientes están clínicamente estables y por tanto deben presentar menos

inflamación de sus vías respiratorias.

Carlson y cols. (144) estudiaron "in vitro" la liberación de PCE y PXE demostrando que están aumentadas en sujetos con asma respecto del grupo control.

En nuestra serie se observa igualmente una correlación entre PCE y PXE y el test de HB con metacolina, encontrando diferencias significativas entre aquellos que presentan test de HB positivo respecto de HB negativo.

Se han realizado diversos trabajos que han demostrado un descenso de los niveles séricos de PCE en sujetos alérgicos polínicos a los que se les ha administrado extractos desensibilizantes como terapéutica etiológica (145,146,147). Además de disminuir las concentraciones séricas de PCE se observó una disminución de la HB, de forma indirecta estos autores atribuyeron la HB de los pacientes estudiados a la existencia de estos marcadores proinflamatorios activados liberados de los eosinófilos. En nuestros resultados no hemos encontrado diferencias significativas entre aquellos sujetos que habían recibido inmunoterapia de los que no. Posiblemente esta discordancia se deba a no tratarse de un estudio evolutivo a lo largo de varios años, sino de una determinación puntual en el proceso de la enfermedad alérgica. Además, la heterogeneidad de los distintos tipos de extractos no permite establecer conclusiones definitivas en este sentido.

Ädelroth (7) ha estudiado las concentraciones de PCE en suero y LBA de pacientes asmáticos y sujetos sanos observando una excelente correlación entre los valores en ambos fluidos. Este hallazgo indica la utilidad de la determinación de la PCE y PXE en suero para valorar la severidad del asma, incluso durante la época extraestacional. Estos datos son concordantes con los expuestos por otros autores (141,142).

Se han realizado diversos trabajos que han confirmado la correlación entre las concentraciones de marcadores de activación inflamatoria y la HB existente en los pacientes alérgicos (8, 148, 149).

Knani (9) y Bisgaard (48) estudiaron los niveles de PXE y PCE respectivamente en fluido nasal de sujetos diagnosticados de rinitis alérgica, encontrando concentraciones significativamente superiores de estos marcadores respecto de los grupos controles. En nuestro trabajo hemos encontrado diferencias significativas en las concentraciones de PCE y PXE en el suero de los pacientes con rinitis alérgica estacional respecto del grupo control.

Venge (150) atribuye los niveles de PCE en suero a la activación de los eosinófilos circulantes en sangre periférica, los cuales tienen aumentada su tendencia a liberar las proteínas del interior de sus gránulos.

En resumen podemos concluir que las concentraciones de PCE y PXE han sido superiores en el grupo de asma respecto



del grupo de rinitis, sin llegar a ser diferencias estadísticamente significativas. La PXE ha sido discretamente superior en su concentración, siendo la diferencia casi significativa ( $p < 0,1$ ) entre ambos grupos. Sí se han encontrado diferencias significativas entre los sujetos con HB positiva respecto de los que fueron test de HB negativo.

Estos hallazgos nos indican la existencia tanto en el asma como en la rinitis alérgica estacional de niveles aumentados de marcadores de activación del eosinófilo incluso fuera de la época primaveral.

Por otra parte la buena correlación observada entre PCE y PXE en suero sugiere que podría ser suficiente la determinación de una sola de las dos proteínas del eosinófilo para valorar la activación del mismo.

Estos resultados sugieren la degranulación de los eosinófilos en los pacientes con rinitis y asma bronquial extrínseco polínico, aún durante fases estables, asintomáticas, sin tratamiento médico alguno y durante la época extraestacional.

#### **5.4. Triptasa.**

El mastocito es la célula más importante implicada en la fase precoz o respuesta inmediata de la reacción de hipersensibilidad tipo I mediada por Ig E que se observa en la rinitis y el asma bronquial extrínseco por

sensibilización a pólenes (15).

En nuestro trabajo intentamos cuantificar las concentraciones de triptasa en suero, como indicador de activación mastocitaria en los pacientes polínicos fuera de la época estacional.

La detección de triptasa en suero de los pacientes con rinitis y/o asma, así como los sujetos del grupo control, resultó infructuosa, siendo en todos los casos indetectable con la técnica radioisotópica utilizada.

La triptasa en LBA ha sido estudiada por diferentes autores (141), encontrándose niveles aumentados en este fluido que sugieren la activación local del mastocito. En la actualidad se considera al mastocito, junto con el eosinófilo, una de las células más importantes en la inflamación detectada en los asmáticos.

No todos los diferentes tipos de asma muestran niveles elevados de triptasa, por ejemplo Jarjour y cols. (151) han estudiado el asma inducido por ejercicio y no han encontrado diferencias significativas tras la prueba de provocación respecto del grupo control.

Bosso (152) ha estudiado los niveles séricos de triptasa en pacientes con asma e intolerancia a antiinflamatorios no esteroideos encontrando aumentos de concentración cuando presentaban afectación clínica cutánea y/o digestiva además de la sintomatología respiratoria, lo

que es sugestivo de la participación de los mastocitos cutáneos y del tracto gastrointestinal además de los mastocitos del árbol respiratorio.

Calhoun (153) estudió los niveles séricos de triptasa e histamina en pacientes asmáticos con exacerbaciones clínicas atribuibles a infección viral, encontrando elevaciones significativas de ambos mediadores.

La triptasa ha sido estudiada en el fluido nasal de sujetos diagnosticados de rinitis alérgica, durante la fase activa de la enfermedad, encontrándose niveles elevados (76).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que durante la fase estable de la polinosis, tanto en los sujetos con rinitis como con asma, el mastocito juega un papel poco relevante, al menos en circulación sistémica, por lo tanto no es útil cuantificar en suero este marcador de activación inflamatorio en época extraestacional.

#### **5.5. Mieloperoxidasa.**

El papel exacto de los neutrófilos en el asma está aún por dilucidar (93). Los estudios realizados hasta el momento sugieren que los neutrófilos tendrían mayor trascendencia en los asmáticos fumadores respecto de los que no lo son (154).

En nuestros resultados no hemos encontrado diferencias

significativas entre el grupo de fumadores respecto del que no lo eran.

En la actualidad se mantiene un cierto papel de las enfermedades infecciosas en el desencadenamiento de las crisis asmáticas. Se valoran las infecciones bacterianas (155) y sobre todo las infecciones víricas (156,157,158).

La MPO se ha utilizado para monitorizar la actividad del neutrófilo. Se ha observado un incremento de este marcador en relación con procesos infecciosos, fundamentalmente de tipo bacteriano aunque también virales, siendo muy útil para discriminar entre diferentes posibles causas de exacerbaciones asmáticas.

Es interesante resaltar que en los criterios de selección de nuestros pacientes y sujetos del grupo control una de las condiciones para ser incluidos era la ausencia, por anamnesis, de padecer o haber padecido en las últimas semanas cualquier tipo de cuadro infeccioso.

Los valores normales en suero de MPO de adultos sanos han sido estudiados por Ahlstedt (61): media 285  $\mu\text{g/l}$ , con rangos al 95 y 100% de 168-478 y 168-745 respectivamente.

Los valores obtenidos en nuestros grupos de rinitis (1099  $\mu\text{g/l}$ ) y asma (1329  $\mu\text{g/l}$ ) son significativamente ( $p < 0,001$ ) superiores a los encontrados en el grupo normal (522  $\mu\text{g/l}$ ). Los pacientes asmáticos muestran concentraciones superiores de MPO en relación con el grupo

rinitis pero sin llegar a ser diferencias estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos en el grupo control se ajustan a los patrones de normalidad de Ahlstedt (61).

La acción del neutrófilo y de la MPO en el asma no está definitivamente aclarada. Palgrem y cols. (159) han estudiado las diferentes proteasas del neutrófilo y sus efectos lesivos a nivel de tejido pulmonar. Buchanan y cols. (160) han estudiado la molécula denominada "actividad quimiotáctica del neutrófilo de alto peso molecular" en el suero de sujetos asmáticos, demostrando altos niveles durante las fases de actividad de la enfermedad, mientras que en las fases de remisión tras el tratamiento se produce un llamativo descenso en las concentraciones de esta molécula.

Roberts y cols. (161) han comparado la toxicidad de los eosinófilos y neutrófilos, demostrando una mayor toxicidad "in vitro" de los eosinófilos, lo que justifica los hallazgos de los autores previamente descritos.

En nuestros pacientes hemos encontrado diferencias significativas entre aquellos que presentaban HB positiva respecto de aquellos que eran HB negativa. No hemos encontrado diferencias significativas entre los diferentes grados de positividad de HB.

De los resultados citados previamente podemos concluir que los neutrófilos de los sujetos alérgicos están

activados, pudiendo jugar algún papel en el desarrollo y mantenimiento de la HB.

#### **5.6. Ácido hialurónico.**

El ácido hialurónico ha sido estudiado en suero y LBA (141) de asmáticos por diferentes autores encontrando diferencias significativas en función del grado de severidad del asma, lo que sugiere una activación del fibroblasto en las vías aéreas de los asmáticos.

En nuestros pacientes hemos encontrado las mayores concentraciones de ácido hialurónico en sujetos con asma ( $33 \mu\text{g/l}$ ), siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) respecto de los sujetos sanos ( $10,5 \mu\text{g/l}$ ). Los pacientes con rinitis ( $25 \mu\text{g/l}$ ) también presentaban concentraciones superiores de ácido hialurónico en relación con el grupo control, pero las diferencias no eran significativas.

Bousquet (141) detectó niveles de ácido hialurónico elevados en LBA de asmáticos respecto de sujetos sanos, independientemente de la etiología, duración del asma o edad de los pacientes. Resultados similares se obtuvieron en suero comparando las concentraciones séricas de ácido hialurónico en asmáticos respecto de un grupo control. Estos resultados sugieren la mayor activación de los fibroblastos en sujetos asmáticos respecto de rinitis.

En nuestros sujetos hemos encontrado diferencias

significativas entre los que presentaban HB positiva respecto de los que eran HB negativa, lo que apoya la participación del fibroblasto en la génesis de la HB de los sujetos polínicos fuera de la estación.

#### **5.7. Test de hiperreactividad bronquial**

La hiperreactividad bronquial es una característica básica del asma bronquial (101), aunque puede observarse en otras enfermedades pulmonares, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (162), la fibrosis quística (163), la sarcoidosis (164), el síndrome del distress respiratorio (165), el pulmón de granjero (166) o la eosinofilia tropical (167). Se ha demostrado también en pacientes con enfermedades no pulmonares como son la dermatitis atópica (168), la insuficiencia ventricular izquierda (169) o la poliposis nasal (170). Incluso algunos sujetos sanos (171) y sobre todo fumadores activos (172) presentan una respuesta positiva al test de provocación inhalativo.

Es importante resaltar que la determinación de HB tiene utilidad diagnóstica, y se emplea también, con algunas limitaciones, para valorar la gravedad del asma. Todas las enfermedades pulmonares y no pulmonares citadas anteriormente que pueden cursar con HB se descartaron mediante cuidadosa anamnesis.

En el grupo de pacientes asmáticos la mayoría (88%) presentaban el test de HB positivo, mientras que en el grupo de pacientes con diagnóstico clínico de rinitis

únicamente una minoría (16%) presentaba esta prueba positiva, existiendo diferencias significativas ( $p < 0,001$ ) entre ambos grupos. Ninguno de los sujetos del grupo control presentaron positividad en el test de HB. Estos resultados coinciden con los encontrados en la literatura (173,174,175).

Prieto (175) realizó un estudio de seguimiento durante un período de 39 a 48 meses en pacientes con rinitis alérgica y prueba de HB positiva, y un 10% de los casos evolucionaron a asma, sugiriendo el posible factor de riesgo de la HB positiva para la evolución posterior de la rinitis alérgica a asma bronquial. Los resultados obtenidos con la prueba de HB positiva en algunos de los pacientes de nuestro grupo de rinitis pueden justificarse como un posible factor de riesgo evolutivo de la enfermedad alérgica.

Diversos autores (176,177) han estudiado la respuesta bronquial a metacolina en pacientes con rinitis y asma polínicos, observando una disminución de la sensibilidad bronquial poco tiempo después de finalizar la época de polinización. Estos hallazgos justificarían los resultados negativos de la prueba de HB en algunos de nuestros pacientes asmáticos. Probablemente estos sujetos tienen un grado leve de HB y al realizarse la prueba durante el otoño-invierno, época en la que no hay pólenes en nuestra región (117), disminuye la reactividad bronquial resultando la prueba negativa. Existen diversos trabajos que describen asma sin HB acompañante en determinados momentos evolutivos



de la enfermedad (178,179,180).

De los resultados obtenidos podemos concluir que el test de metacolina es la prueba más sensible en la actualidad para diferenciar sujetos con rinitis de aquellos que presentan historia clínica sugestiva de asma bronquial.

#### **5.8. Correlación marcadores séricos de inflamación e HB**

La presencia de los distintos marcadores de activación proinflamatorios en suero (181), LBA (141), esputo (182), secreción nasal (183) e incluso en biopsias (184) se ha relacionado con los distintos grados de severidad del asma y de la rinitis polínicas.

En nuestros resultados hemos encontrado niveles significativamente superiores de PCE, PXE, MPO y ácido hialurónico en el suero de los pacientes que presentaban test de HB positivo respecto de aquellos que tenían el test de metacolina negativo.

El grado de correlación obtenido entre el grado de HB y las concentraciones de marcadores proinflamatorios estudiados ha sido escaso. Este resultado podría justificarse por la época en la que se ha realizado el estudio, otoño-invierno, cuando los pacientes polínicos presentan una disminución del grado de HB, debida probablemente a la no exposición a los pólenes y por tanto con un menor grado de inflamación bronquial. En estudios realizados durante la época estacional existe un elevado

grado de correlación entre estos marcadores y el grado de HB (185).

Se han publicado diversos trabajos en los que se ha encontrado una correlación más alta entre algunos de estos marcadores y las distintas pruebas de HB efectuadas (186). Posiblemente nuestros resultados difieren por la época de realización del estudio.

#### **5.9. Niveles críticos de decisión obtenidos.**

Galen y Gambino (125) establecieron los umbrales del punto de corte de sensibilidad y especificidad que deben considerarse significativos y no atribuibles al azar, por encima del 50%.

Con el fin de estudiar el rendimiento diagnóstico de los marcadores de activación proinflamatorios estudiados para discriminar entre los dos grupos de población estudiados, prueba de HB positiva respecto de prueba HB negativa, se calculó la sensibilidad y especificidad de los valores porcentuales para cada parámetro a diferentes concentraciones. Para calcular el nivel crítico de decisión se representaron las curvas características operador-receptor de sensibilidad y especificidad, obteniéndose los puntos de corte para cada marcador.

Para la PCE se obtuvo el punto de corte en la concentración de 21  $\mu\text{g/l}$ , con un valor de sensibilidad y especificidad del 65% (Figura 1).

Para la PXE se obtuvo el punto de corte en la concentración de 34  $\mu\text{g/l}$ , con un valor de sensibilidad y especificidad del 63% (Figura 2).

Para la MPO se obtuvo el punto de corte en la concentración de 800  $\mu\text{g/l}$ , con un valor de sensibilidad y especificidad del 68% (Figura 3).

Para el AH se obtuvo el punto de corte en la concentración de 30  $\mu\text{g/l}$ , con un valor de sensibilidad y especificidad del 67% (Figura 4).

Todos los marcadores tuvieron un comportamiento similar. Sólo se aumenta la especificidad en cada parámetro si se disminuye sensibilidad. Estos resultados implican un escaso rendimiento diagnóstico de la PCE, PXE, MPO y AH para discriminar entre sujetos con test de HB positivo frente sujetos con test de HB negativo.

La monitorización "in vitro" del asma bronquial es un reto de difícil consecución, pero los resultados de distintos autores apoyan la futura utilidad de estos marcadores en el seguimiento de la enfermedad alérgica (187,188,189).

En la actualidad se consideran elementos válidos de control y seguimiento las pruebas de función respiratoria (190,191), la medición del PEF con aparatos portátiles en el domicilio (111,192) y la realización de test de provocación inhalativa (178,193).

En cualquier caso las positividades encontradas en nuestros resultados pueden ayudar a establecer el grado de severidad de la enfermedad alérgica, pues sí hemos objetivado diferencias entre aquellos sujetos con test de HB positivo con respecto de los que no lo presentaban.

## **6. CONCLUSIONES**

1. Los pacientes diagnosticados de rinitis y asma bronquial polínico presentan un aumento significativo de los niveles séricos de Ig E total, Ig E específica frente a pólenes y del recuento de eosinófilos durante la época extraestacional en relación con el grupo control, sin que exista relación con el grado de hiperreactividad bronquial.

2. Los pacientes asmáticos polínicos presentan un grado leve-moderado de hiperreactividad bronquial inespecífica (H.B.I.) durante la época extraestacional, cuando se encontraban clínicamente asintomáticos y sin realizar tratamiento médico. Esta H.B.I. es significativamente superior a la presentada por los pacientes afectados de rinitis y sujetos del grupo control.

3. Las concentraciones de PCE y PXE son significativamente superiores en los sujetos polínicos respecto del grupo control. Los niveles séricos de PCE y PXE son superiores en los pacientes asmáticos respecto de los afectados de rinitis, sin llegar a ser significativos, fuera de la época estacional. De los datos anteriores se deduce que tanto la PCE como la PXE son marcadores útiles en la monitorización "in vitro" fuera de la época estacional en sujetos polínicos.

4. Existe un elevado grado de correlación entre las concentraciones séricas de PCE y PXE, por lo que pudiera ser suficiente determinar una de estas dos proteínas para evaluar la activación de los eosinófilos en sujetos asmáticos.

5. Los niveles séricos de MPO y AH son significativamente superiores en pacientes polínicos, diagnosticados de rinitis o asma, respecto del grupo control, lo que sugiere la participación de otras células, neutrófilos y fibroblastos, en la inflamación bronquial de estos pacientes.

6. Las concentraciones de PCE, PXE, MPO y AH son significativamente superiores en pacientes con test de HB positivo respecto de pacientes y sujetos con test de HB negativo, indicando la participación de las células que producen estos mediadores en el mantenimiento de la HB.

7. Existe un moderado nivel de correlación entre el grado de H.B.I. de los pacientes asmáticos y los marcadores séricos de inflamación, por lo que la monitorización en el suero de estos marcadores puede ser útil para la evaluación global en esta enfermedad.

8. La triptasa en suero no es detectable y por tanto no es un marcador útil de inflamación en sujetos con asma en época extraestacional.

9. El tabaco y la inmunoterapia recibida previamente no influyen en las concentraciones de los marcadores inflamatorios estudiados de los sujetos polínicos.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Rubio M, Zapatero L, Redondo G. Asma bronquial: definición y epidemiología. Tratado de Alergología e Inmunología Clínica. Ed. Luzán. Madrid. 1986, Tomo III. Capítulo 3: 65-81.
2. American Thoracic Society: Standards for the diagnostic and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. Am Rev Respir Dis 1987; 136: 225-243.
3. Laitinen LA, Heino M, Laitinen A, Kava T, Haahtela T. Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. Am Rev respir Dis 1985; 131: 599-606.
4. Howarth PH, Wilson JW, Djukanovic R, et al. Airway inflammation and atopic asthma: a comparative bronchoscopy investigation. Int Arch Allergy Appl Immunol 1991; 94: 266-269.
5. Barnes PJ. New concepts in the pathogenesis of bronchial hiperresponsiveness and asthma. J Allergy Clin Immunol 1989; 83: 1013-1026.
6. International report. International consensus report on diagnosis and treatment of asthma. US Department of Health and Human Services. Bethesda: National Institutes of Health, Publication N° 92-3091, march 1992.
7. Ädelroth E, Rosenthal L, Johansson S-A, Linden M, Venge P. Inflammatory cells and eosinophilic activity in asthmatics investigated by bronchoalveolar lavage: the effects of antiasthmatic treatment with budesonide or terbutaline. Am Rev Respir Dis 1990; 142: 91-99.
8. Sugai T, Sakiyama Y, Matumoto S. Eosinophil cationic protein in peripheral blood of pediatric patients with allergic diseases. Clin Exp Allergy 1992; 22: 275-281.
9. Knani J, Campbell A, Enander I, et al. Indirect evidence of nasal inflammation assessed by titration of inflammatory mediators and enumeration of cells in nasal secretions of patients with chronic rhinitis. J Allergy Clin Immunol 1992; 90: 880-889.
10. Moobel R, Barkans BL, Durham SR, Kay AB. Application of monoclonal antibodies against major basic protein (BMK-13) and eosinophil cationic protein (EG1 and EG2) for quantifying eosinophils in bronchial biopsies from atopic asthma. Clin Exp Allergy 1992; 22: 265-273.
11. Hakanson L, Rak S, Dahl R, Venge P. The formation of eosinophil and neutrophil chemotactic activity during a pollen season and after allergen challenge. J Allergy Clin Immunol 1989; 83: 933-939.

12. Venge P, Henriksen J, Dahl R. Eosinophils in exercise-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 699-704.
13. Scadding JG. Definición y categorización clínica. En: Weiss EB, Segal MS, Stein M. Asma bronquial: mecanismos y terapéutica. Ed. IMESA. Madrid. 1986: 3-13.
14. Solomon WR, Mathews KP. Aerobiología y alérgenos inhalables. En: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW. Alergia: principios y práctica. Ed. Salvat. Barcelona. 1992: 295-352.
15. Roitt I, Brostoff J, Male D. Hipersensibilidad tipo I. En: *Inmunología*. Ed. Salvat. Barcelona. 1991: 19.1-19.20.
16. Wierenga EA, Snoek M, Hejden FL, et al. Regulation of immunoglobulin E synthesis by T-cell clones. En: Godard P, Bousquet J, Michel FB. *Advances in allergology and clinical immunology*. Ed. The Parthenon. Lancs (England). 1992: 23-34.
17. Capron AR, Dessaint JP, Joseph M, Capron M. The immunobiological functions of immunoglobulin (Ig E) and Ig E receptors. In: Godard P, Bousquet J, Michel FB. *Advances in allergology and clinical immunology*. Ed. The Parthenon. Lancs (England). 1992: 49-56.
18. Talbot SF, Atkins PC, Valenzano M, Zweiman B. Correlation of in vivo mediator release with late cutaneous allergic responses in humans. Kinetics of histamine release. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 819-826.
19. Lawlor GJ, Tashkin DP. Asma. En: Lawlor GJ, Fisher TJ. *Manual de Alergia e Inmunología*. Ed. Salvat. Barcelona. 1990: 139-202.
20. Mygning N. Fiebre del heno. En: *Alergia nasal*. Ed. Salvat. Barcelona. 1988: 221-224.
21. Aaronson DW, Rosenberg M. Asma: conceptos generales. En: Patterson R. *Enfermedades alérgicas: diagnóstico y tratamiento*. Ed. CEA. Madrid. 1988: 253-303.
22. Ellis AG. The pathological anatomy of bronchial asthma. *Am J Med Sci* 1908; 136: 407-429.
23. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY. Eosinophilic inflammation in asthma. *New Engl J Med* 1990; 323: 1033-1039.
24. Nutman T, Ottesen E, Cohen S. Eosinofilia y trastornos relacionados con los eosinófilos. En: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW. *Alergia, principios y práctica*. Ed. Salvat. Barcelona. 1992: 806-831.

25. Booth BH. Eosinofilia. En: Patterson R. Enfermedades alérgicas, diagnóstico y tratamiento. Ed. CEA. Madrid. 1988: 799-821.
26. Chapman ID, Foster A, Morley J. The relationship between inflammation and hiperreactivity of the airways in asthma. Clin Exp Allergy 1993; 23: 168-171.
27. Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. Am Rev Respir Dis 1988; 137: 62-69.
28. Casale TB, Wood D, Richardson HB, et al. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with metacholine bronchial hyperresponsiveness. J Clin Invest 1987; 79: 1197-1203.
29. Lopez AF, Sanderson CJ, Gamble JR, Campbell HD, Young IG, Vadas MA. Recombinant human interleukin-5 (IL-5) is a selective activator of human eosinophil function. J Exp Med 1988; 167: 219-224.
30. Frigas E, Gleich GJ. The eosinophil and the pathophysiology of asthma. J Allergy Clin Immunol 1986; 77: 527-537.
31. Negro JM, Hernández J, Sola J, Pascual A, García FJ. Eosinofilia e histamina en esputo de pacientes con asma bronquial. Rev Esp Alergol Inmunol Clin 1992; 7: 27-32.
32. Griffin E, Hakanson L, Formgren H, Jörgensen K, Peterson C, Venge P. Blood eosinophil number and activity in relation to lung function in patients with asthma and with eosinophilia. J Allergy Clin Immunol 1991; 87: 548-557.
33. Godard P, Bousquet J, Lebel B, Michel FB. Bronchoalveolar lavage in asthmatic. Bull Eur Physiopathol Respir 1987; 23: 73-85.
34. Kay AB. Asthma and inflammation. J Allergy Clin Immunol 1991; 87: 893-910.
35. Dulfano MJ, Ishikawa S. Esputo en el asma bronquial. En: Weiss EB, Segal MS, Stein M. Asma bronquial: mecanismos y terapéuticas. Ed. IMESA. Madrid. 1986: 543-556.
36. Azofra J, Sastre J, Gómez B, Rivas F, Sastre A. Some cytological aspects of bronchial asthma. Allergol Immunopathol 1986; 14: 295-301.
37. Fick RB, Richerson HB, Zavala DC, Hunninghake GW. Bronchoalveolar lavage in allergic asthmatics. Am Rev Respir Dis 1987; 135: 1204-1209.

38. Calderon J. Significado del eosinófilo en el lavado broncoalveolar. Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid. 1991.
39. Workshop summary and guidelines: investigative use of bronchoscopy, lavage and bronchial biopsies in asthma and other airways diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 808-814.
40. Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev respir Dis* 1990; 142: 434-457.
41. Gleich GJ. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 422-436.
42. Dunnill MS. The pathology of asthma with special reference to changes in the bronchial mucosa. *J Clin Pathol* 1960; 13: 27-33.
43. Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, et al. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 1407-1413.
44. Venge P. The eosinophil. In: Godard P, Bousquet J, Michel FB. *Advances in allergology and clinical immunology*. Ed. The Parthenon. Lancs (England). 1992: 175-183.
45. Lundgren JD, Davey RT, Lundgren B, Mullol J, Marom Z. Eosinophil cationic protein stimulates and major basic protein inhibits airway mucus secretion. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 689-698.
46. Fredens K, Dahl R, Venge P. In vitro studies of the interaction between heparin and eosinophil cationic protein. *Allergy* 1981; 36: 129-133.
47. Dahl R, Venge P, Olsson I. Variation of blood eosinophils and eosinophil cationic protein in serum in patients with bronchial asthma. *Allergy* 1978; 33: 211-215.
48. Bisgaard H, Gronborg H, Mygind N, Dahl R, Lindquist N, Venge P. Allergen induced increase of eosinophil cationic protein in nasal lavage fluid: effect of the glucocorticoid budesonide. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85: 891-895.
49. Virchow JC, Hölscher U, Virchow C. Sputum ECP levels correlate with parameters of airflow obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 604-606.
50. Schmekel B, Blom-Bülow B, Hörnblad Y, et al. Granulocytes and their secretory products, myeloperoxidase and eosinophil cationic protein, in bronchoalveolar lavage fluids from two lung lobes in normal subjects. *Eur Respir J* 1991; 4: 867-871.

51. Frandsen B, Lose G. Determination of eosinophil cationic protein in urine by an enzyme immunoassay. *Scand J Clin Lab Invest* 1986; 46: 629-634.
52. De Monchy JGR, Henk F, Kauffman H, et al. Bronchoalveolar eosinophilia during allergen-induced late asthmatic reactions. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146: 604-606.
53. Gullberg U, Widegren B, Arnason U, Egesten A, Olsson I. The cytotoxic eosinophil cationic protein (ECP) has ribonuclease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139: 1239-1242.
54. Henderson WR, Jörg A, Klebanoff SJ. Eosinophil peroxidase mediated inactivation of leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub>. *J Immunol* 1982; 128: 2609-2613.
55. Gleich GJ, Adolphson CR. The eosinophil leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 1986; 39: 177-253.
56. Weller PF. The immunobiology of eosinophils. *N Engl J Med* 1991; 324: 1110-1118.
57. Durham SR, Kay AB. Eosinophils, bronchial hyperreactivity and late phase asthmatic reactions. *Clin Allergy* 1985; 15: 411-418.
58. Venge P, Roxin L, Olson I. Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein. *Br J Haematol* 1977; 37: 331-335.
59. Durham SR, Loegering DA, Dunnette S, Gleich GJ, Kay AB. Blood eosinophils and eosinophil-derived protein in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1989; 84: 1-14.
60. Carlson M, Hakanson L, Peterson C, Stalenheim G, Venge P. Secretion of granule protein from eosinophils and neutrophils is increased in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 27-35.
61. Ahlstedt S, Enander I, Peterson C, Rak S, Venge P. Clinical component of asthma with emphasis on the eosinophils. *Pharmaceutical Medicine* 1992; 6: 99-111.
62. Shaw RJ, Cromwell O, Kay B. Preferential generation of leukotriene C<sub>4</sub> by human eosinophils. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 712-722.
63. Lee TC, Lenihan DJ, Malone B, Roddy L, Wasserman S. Increased biosynthesis of platelet activating factor in activated human eosinophils. *J Biol Chem* 1984; 259: 5526-5530.

64. Galli SJ, Lichtenstein LM. Biología de los mastocitos y basófilos. En: Middleton E, Reed C, Ellis E, Adkinson F, Yunginger J: Alergia: principios y práctica. Ed. Salvat. Barcelona. 1992: 100-127.
65. Wasserman SI. Mast cell biology. J Allergy Clin Immunol 1990; 86: 590-593.
66. Castells MC, Irani AM, Schwartz LB. Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. J Immunol 1987; 138: 2184-2189.
67. Schwartz LB, Lewis RA, Austen KF. Tryptase from human pulmonary mast cells: purification and characterization. J Biol Chem 1981; 256: 11939-11943.
68. Neijews HJ, Degenhart HJ, Raatgeep R, Kerrebijn KF. The correlation between increased reactivity of the bronchi and of mediator releasing cells in asthma. Clin Allergy 1980; 10: 535-539.
69. Nagakura T, Lee TH, Assoufi BK, Newman-Taylor AJ, Denison DM, Kay AB. Neutrophil chemotactic factor in exercise and hyperventilation induced asthma. Am Rev Respir Dis 1983; 128: 294-296.
70. Tomioka M, Ida S, Shindoh Y, Ishihara T, Takishima T. Mast cells in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. Am Rev Respir Dis 1984; 129: 1000-1005.
71. Lowman MA, Rees PH, Benyon RC, Church MK. Human mast cell heterogeneity: histamine release from mast cells dispersed from skin, lung, adenoids, tonsils and intestinal mucosa in response to Ig E dependent and non immunological stimuli. J Allergy Clin Immunol 1988; 81: 590-597.
72. Church MK, Okayama Y, El-Lati S, Hunt TC, Bradding P, Walls AF. Human mast cells in acute and chronic allergic responses. In: Godard Ph, Bousquet J, Michel FB. Advances in Allergology and Clinical Immunology. Ed. The Parthenon. Lancs (England). 1992: 195-205.
73. Schwartz LB, Kawahara MS, Hugli Te, Vik D, Fearon DT, Austen KF. Generation of C3a anaphylatoxin from human C3 by human mast cell tryptase. J Immunol 1983; 130: 1891-1895.
74. Tanaka T, Mcrae BJ, Cho K, Cook R, Fraki JE, Johnson DA, Powers JC. Mammalian tissue trypsin-like enzymes. Comparative reactivities of human skin tryptase, human lung tryptase, and bovine trypsin with peptide 4-nitroanilide and thioester substrates. J Biol Chem 1983; 258(22): 13552-13557.
75. Wenzel S, Irani AM, Sanders JM, Bradford TR, Schwartz LB. Immunoassay of tryptase from human mast cells. J Immunol Methods 1986; 86(1): 139-142.

76. Castells M, Schwartz LB. Tryptase levels in nasal lavage fluid as an indicator of the immediate allergic response. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 348-355.
77. Kandelerian R, Raju L, Roth W, Schwartz LB, Gruber B, Janoff A. Elevated histamine and tryptase levels in smokers' bronchoalveolar lavage fluid. Do lung mast cells contribute to smokers'emphysema?. *Chest* 1988; 94: 119-123.
78. Churg MK, Pao GJ, Holgate ST. Characterization of histamine secretion from mechanically dispersed human lung mast cells: effects of anti IgE, calcium ionophore A23187, compound 48/80, and basic polypeptides. *J Immunol* 1982; 129: 2116-2121.
79. Rankin JA, Kaliner M, Reynolds HY. Histamine levels in bronchoalveolar lavage from patients with asthma, sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 79: 371-377.
80. Keyzer JJ, Kauffman HF, De Monchy JGR, Keyzer-Udding JJ, De Vries K. Urinary N-Methyl-Histamine during early and late allergen induced bronchial-obstructive reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 74: 240-245.
81. Benyon RC, Robinson C, Holgate ST, Church MK. Prostaglandin D2 release from human skin mast cells in response to ionophore A23187. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 635-638.
82. Robinson C, Benyon RC, Holgate ST, Church MK. The Ig E and calcium dependent release of eicosanoids and histamine from human cutaneous mast cells. *J Invest Dermatol* 1989; 93: 397-404.
83. Benyon CR, Robinson C, Church MK. Differential release of histamine and eicosanoids from human skin mast cells activated by Ig E dependent and non immunological stimuli. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 898-904.
84. Melewicz FM, Kline NE, Cohen AB, Spiegelberg HL. Characterization of Fc receptor for Ig E on human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 1982; 49: 364-370.
85. Joseph M, Tonnel AB, Torprier G, Capron A, Arnoux B. Involvement of Ig E in the secretory processes of alveolar macrophages from asthmatic patients. *J Clin Invest* 1983; 71: 221-330.
86. Diaz P, Gonzalez MC, Galleguillos FR. Leucocytes and mediators in bronchoalveolar lavage during allergen induced late phase asthmatic reaction. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139: 1383-1389.



87. Vargaftig BB, Lefort J, Chignard M, Benveniste J. Platelet activating factor induces a platelet dependent bronchoconstriction unrelated to the formation of prostaglandin derivatives. *Eur J Pharmacol* 1980; 65: 185-192.
88. Knauer KA, Lichtenstein LM, Adkinson NF, Fish JE. Platelet activation during antigen induced airway reactions in asthmatic subjects. *N Engl J Med* 1981; 304: 1404-1407.
89. Metzger WJ, Hunninghake GW, Richerson HB. Late asthmatic reactions: inquiry into mechanism and significance. *Clin Rev Allergy* 1985; 3: 145-165.
90. Leung DYM, Geha RS. Regulation of the human IgE antibody response. *Intern Rev Immunol* 1987; 2: 75-91.
91. Timonen T, Stenius-Aarnala B. Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Immunol* 1985; 59: 85-90.
92. Schmekel B, Karlsson SE, Linden M, Sundström C, Tegner H, Venge P. Myeloperoxidase in human lung lavage: a marker of local neutrophil activity. *Inflammation* 1990; 14: 447-454.
93. Nagy L, Tee TH, Kay AB. Neutrophil chemotactic activity in antigen-induced late asthmatic reactions. *N Engl J Med* 1982; 306: 497-501.
94. Carroll M, Durham SR, Walsh GM, Kay AB. Activation of neutrophils and monocytes after allergen and histamine induced bronchoconstriction. *J Allergy Clin Immunol* 1985; 75: 290-296.
95. Dunnill MS, Massarella GR, Anderson JR. A comparison of the quantitative anatomy of the bronchi in normal subjects, in status asthmatics, in chronic bronchitis and in emphysema. *Thorax* 1969; 24: 176-179.
96. Cutz E, Levison H, Cooper DM. Ultrastructure of airways in children with asthma. *Histopathology* 1978; 2: 407-421.
97. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989; 1: 520-524.
98. Rickman PI, Tilly R, Jass JR, Bodmer WF. Colonic pericrypt sheath cells: characterisation of cell type with a new monoclonal antibody. *J Clin Pathol* 1987; 40: 593-600.
99. Laitinen LA, Laitinen A. Mucosal inflammation and bronchial hyperreactivity. *Eur Respir J* 1988; 5: 488-489.

100. Hunter JA, Finkbeiner WE, Nadel JA, Goetzl EJ, Holtzman MJ. Predominant generation of 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid by epithelial cells from human trachea. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4633-4637.
101. Boushey HA, Holtzman MJ, Sheller JR, Nadel JA. Bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121: 389-413.
102. Hargreave FE, Dolovich J, O'Byrne PM, Ramsdale EH, Daniel EE. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1986; 78: 825-832.
103. Benson MK. Bronchial Hyperreactivity. *Br J Dis Chest* 1975; 69: 227-239.
104. Shiner RJ, Molho MI. Comparison between an alfa-adrenergic antagonist and a beta-adrenergic agonist in bronchial asthma. *Chest* 1983; 83: 602-606.
105. Middleton E Jr. Airway smooth muscle, asthma and calcium ions. *J Allergy Clin Immunol* 1984; 73: 643-650.
106. Gómez-Terreros FJ, Callol L, Calderón J, y cols. Bases anatómicas de la hiperreactividad bronquial. Libro de resúmenes del XXVIII Congreso Internacional de Medicina y Farmacia Militares. 1990: 403.
107. Spector S. Pruebas de provocación bronquial. En: Weis EB, Segal MS, Stein M. *Asma bronquial: mecanismos y terapéuticas*. Ed. IMESA. Madrid. 1986: 358-384.
108. Cockcroft DW, Ruffin RE, Frith PA. Determinants of allergen-induced asthma: Dose of allergen, circulating Ig E antibody concentration and bronchial responsiveness to inhaled histamine. *Am Rev Respir Dis* 1979; 120: 1053-1058.
109. Killian D, Cockcroft DW, Hargreave FE, Dolovich J. Factors in allergen-induced asthma: relevance of the intensity of the airways allergenic reaction and non-specific bronchial reactivity. *Clin Allergy* 1976; 6: 219-225.
110. Cartier A, Bandouvakis J, Ryan G, Dolovich J, Hargreave FE. Asthma and increased non allergic bronchial responsiveness to metacholine during natural exposure to ragweed pollen. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121(A): 61.
111. Quackenboss JJ, Lebowitz MD, Krzyzanowski M. The normal range of diurnal changes in peak expiratory flow rates: relationship to symptoms and respiratory diseases. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 323-330.

112. Pepys J, Hutchcroft BJ. Bronchial provocation tests in etiologic, diagnosis and analysis of asthma. *Am Rev Respir Dis* 1975; 112: 829-859.
113. Smith AP. Response of aspirin-allergic patients to challenge by some analgesics in common use. *Br Med J* 1971; 2: 494-496.
114. Dantzker DR, Pingleton SK, Pierce JA, Niewoehner DE, Thurlbeck WM. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136: 225-243.
115. Gibson GJ. Clinical tests of respiratory function. Ed MacMillan Press. London 1984: 171-175.
116. Anderson SD, Silverman M, Konig P, Godfrey S. Exercise-induced asthma. *Br J Dis Chest* 1975; 69: 1-39.
117. Subiza E, Subiza FJ, Jerez M. Arboles, hierbas y plantas de interés alergológico en España. En: *Tratado de Alergología e Inmunología Clínica*. Ed. Luzán. Madrid. 1986, Tomo IV: 257-366.
118. Jimenez-Ruiz C, Rodriguez F, Solano S, et al. Celularidad del lavado broncoalveolar en fumadores. *Arch Bronconeumol* 1989; 25: 69-70.
119. Alvarez-Sala R. El lavado broncoalveolar. Estudio de sus componentes citológico y bioquímico como valores de referencia. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1990.
120. Bousquet J.. Métodos in vivo para el estudio de la alergia: pruebas cutáneas, técnicas e interpretaciones. En: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW. *Alergia: principios y práctica*. Ed. Salvat. Barcelona. 1992: 396-412.
121. Sevillano C. Valoración de la reactividad bronquial inespecífica en la enfermedad asmática. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1990.
122. Questionnaire on respiratory symptoms. Aproved by Medical Researchs. Council's Committee on Research into chronic bronchitis, 1976.
123. Leimgruber A, Mosimann B, Claeys M, et al. Clinical evaluation of a new in vitro assay for specific Ig E, the immuno CAP system. *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 127-131.
124. Peterson CGB, Jörnvall H, Venge P. Purification and characterization of eosinophil cationic protein from normal human eosinophils. *Eur J Haematol* 1988; 40: 415-423.

125. Galen RS. Aplicación del modelo de valores predictivos en el análisis de eficiencia de las pruebas. En: Clínicas de Laboratorio en Medicina. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 1982: 13-27.
126. Mathison D A. El asma en los adultos: diagnóstico y tratamiento. En: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW. Alergia: principios y práctica. Ed. Salvat, Barcelona. 1992: 989-1015.
127. Dreborg S. Skin tests used in type I allergy testing. Allergy 1989; 44: 13-21.
128. Senent C. Inmunoglobulina E. En: Senent C, Gozalo F. Pregrado Alergología. Ed. Luzán. Madrid. 1985: 35-45.
129. Zetterström O, Johanson SG. Ig E concentrations measured by Phadebas Ig E PRIST in serum of healthy adults and in patients with respiratory allergy. Allergy 1981; 36: 537-547.
130. Homburger HA, Katzmann JA. Métodos de laboratorio en inmunología. En: Middleton EJ, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW. Alergia: principios y práctica. Ed. Salvat. Barcelona. 1992: 380-395.
131. Tsuda S, Miyasato M, Iryo K, et al. Eosinophil phenotypes in bullous pemphigoid. J Dermatol 1992; 19: 270-279.
132. Hällgren R, Gudbjörnsson B, Larsson E, Fredens K. Deposition of eosinophil cationic protein in vascular lesions in temporal arteritis. Ann Rheum Dis 1991; 50: 946-949.
133. Hällgren R, Bjelle A, Venge P. Eosinophil cationic protein in inflammatory synovial effusions as evidence of eosinophil involvement. Ann Rheum Dis 1984; 43: 556-562.
134. McLaren DJ, McKean JR, Olsson I, Venge P, Kay AB. Morphological studies on the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by human eosinophil and neutrophil cationic proteins in vitro. Parasit Immunol 1981; 3: 359-373.
135. Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. Nature 1986; 321: 613-616.
136. Hamann KJ, Gleich GJ, Checkel JL, et al. In vitro killing of microfilariae of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* by eosinophil granule proteins. J Immunol 1990; 144: 3166-3173.

137. Barker RL, Loegering DA, Ten RM, et al. Eosinophil cationic protein: comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. *J Immunol* 1989; 143: 952-955.
138. Czech W, Krutmann J, Schöpf E, Kapp A. Serum eosinophil cationic protein is a sensitive measure for disease activity in atopic dermatitis. *B J Dermatol* 1992; 126: 351-355.
139. Lundin A, Fredens K, Michaelson G, Venge P. Eosinophils in allergic contact dermatitis. *Acta Dermatol Res* 1991; 283: 5-6.
140. Rak S, Hakansson L, Venge P. Immunotherapy abrogates the generation of eosinophil and neutrophil chemotactic activity during pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 706-713.
141. Bousquet J, Chanez P, Lacoste J, et al. Indirect evidence of bronchial inflammation assessed by titration of inflammatory mediators in BAL fluid of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 649-660.
142. Carlson M, Peterson C, Venge P. The influence of IL-3, IL-5 and GM-CSF on normal human eosinophil and neutrophil C3b induced degranulation. *Allergy* 1993; 48: 437-442.
143. Venge P, Dahl R, Peterson CGB. Eosinophil granule proteins in serum after challenge of asthmatic patients and the effects of antiasthmatic medication. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988; 87: 306-312.
144. Carlson M, Hakansson L, Kämpe M, Stalenheim G, Venge P. Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89: 131-139.
145. Rak S. Effects of immunotherapy on the inflammation in pollen asthma. *Allergy* 1993; 48: 125-128.
146. Rak S, Peterson C, Enander I. The eosinophil granulae proteins (ECP, EPX) in acute asthma. *Allergy Clin Immunol*. Abstracts of XIV International Congress of Allergology and Clinical Immunology. Kyoto 1991. Abstract 863.
147. Rak S, Löwhagen O, Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 82: 470-480.
148. Hedling G, Ahlstedt S, Hakansson L, Venge P. Levels in serum of eosinophil cationic protein, eosinophil chemotactic activity and tryptase before and during bronchial challenge in cat allergic children with asthma. *Ped Allerg Immunol* 1992; 3: 144-149.

149. Zimmerman B, Lanner A, Enander I, Zimmerman RS, Peterson CGB, Ahlstedt S. Total blood eosinophils, serum eosinophil cationic protein and eosinophil protein X in childhood asthma: relation to disease status and therapy. Clin Exp Allergy 1993; 23: 564-570.
150. Venge P. Serum measurements of eosinophil cationic protein in bronchial asthma. Clin Exp Allergy 1993; 23: 3-7.
151. Jarjour NN, Calhoun WJ. Exercise-induced asthma is not associated with mast cell activation or airway inflammation. J Allergy Clin Immunol 1992; 89: 60-68.
152. Bosso JV, Schwartz LB, Stevenson DD. Tryptase and histamine release during aspirin-induced respiratory reactions. J Allergy Clin Immunol 1991; 88: 830-837.
153. Calhoun WJ, Swenson CA, Dick EC, et al. Experimental rhinovirus 16 infection potentiates histamine release after antigen bronchoprovocation in allergic subjects. Am Rev Respir Dis 1991; 144: 1267-1273.
154. Fujisawa T, Kephart GM, Gray BH, Gleich GJ. The neutrophil and chronic allergic inflammation: immunochemical localization of neutrophil elastase. Am Rev Respir Dis 1990; 141: 689-697.
155. Hudgel DW, Lanston E Jr, Selner JC, McIntosh K. Viral and bacterial infections in adults with chronic asthma. Am Rev Respir Dis 1979; 120: 393-397.
156. Welliver RC, Wong DT, Sun M, Middleton E Jr, Vaughan RS, Ogra PL. The development of respiratory syncytial virus specific Ig E and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection. N Engl J Med 1991; 305: 841-846.
157. Welliver RC, Sun M, Rinaldo D, Ogra PL. Predictive value of respiratory syncytial virus-specific Ig E response for recurrent wheezing following bronchiolitis. J Pediatr 1986; 109: 776-880.
158. Busse WW, Swenson CA, Borden EC, Treuhaupt MW, Dick EC. The effect of influenza A virus on leukocyte histamine release. J Allergy Clin Immunol 1983; 71: 382-388.
159. Palmgren MS, De Shazo R, Carter RM, Zimny ML, Shah SV. Mechanisms of neutrophil damage to human alveolar extracellular matrix: the role of serine and metalloproteases. J Allergy Clin Immunol 1992; 89: 905-915.
160. Buchanan DR, Cromwell O, Kay AB. Neutrophil chemotactic activity in acute severe asthma (status asthmaticus). Am Rev Respir Dis 1987; 136: 1397-1402.

161. Roberts RL, Ank BJ, Stiehm ER. Human eosinophils are more toxic than neutrophils in antibody-independent killing. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 1105-1115.
162. Ramsdell JW, Nachtwey FJ, Moser KM. Bronchial hyperreactivity in chronic obstructive bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 1982; 126: 829-832.
163. Eggleston PA, Rosenstein BJ, Stackhouse CM, Alexander MF. Airway hyperreactivity in cystic fibrosis. Clinical correlates and possible effects on the course of the disease. *Chest* 1988; 94: 360-365.
164. Bechtel JJ, Starr T, Dantzker D, Bower JS. Airway hyperreactivity in patients with sarcoidosis. *Am rev respir Dis* 1981; 124: 759-761.
165. Simpson DL, Goodman M, Spector SL, Petty TL. Long-term follow-up and bronchial reactivity testing in survivors of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev respir Dis* 1978; 117: 449-454.
166. Freedman PM, Ault B. Bronchial hyperreactivity to methacholine in farmers lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 67: 59-63.
167. Chhabra SK, Gaur SN. Airway hyperreactivity in tropical pulmonary eosinophilia. *Chest* 1988; 93: 1105-1106.
168. Barker AF, Hirshman CA, D'Silva R, Hanifin JM. Airway responsiveness in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 87: 780-783.
169. Snashall PD, Chung KF. Airway obstruction and bronchial hyperresponsiveness in left ventricular failure and mitral stenosis. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 945-956.
170. Miles-Lawrence R, Kaplan M, Cheng K. Metacholine sensitivity in nasal polyposis and the effects of polypectomy (abstract). *J Allergy Clin Immunol* 1982; 69: 102.
171. Malo JL, Pineau L, Cartier A, Martin RR. Reference values of the provocative concentrations of methacholine that cause 6% and 20% changes in forced expiratory volume in one second in a normal population. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 8-11.
172. Taylor DR, Reid WD, Paré DD, Fleetham JA. Cigarette smoke inhalation patterns and bronchial reactivity. *Thorax* 1988; 43: 65-70.

173. Hargreave FE, Ramsdale EH. Hipersensibilidad de las vías aéreas frente a la metacolina o la histamina: mecanismos. En: Middleton E, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF, Yunginger JW. Alergia, principios y práctica. Ed. Salvat. Barcelona. 1992: 931-938.
174. Boulet PH, Cartier A, Thomson NC, et al. Asthma and increases in nonallergic bronchial responsiveness from seasonal pollen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 71: 399-406.
175. Prieto L. Obstrucción al flujo aéreo e hiperexcitabilidad bronquial en la rinitis alérgica. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1990; 5: 57-69.
176. Prieto L, Bertó JM, López M, Peris A. Modificaciones de la hiperrespuesta bronquial en pacientes polínicos. *Rev Esp Alergol Inmunol Clin* 1992; 7: 49-53.
177. Cartier A, Thomson NC, Frith PA, Roberts R, Hargreave FE. Allergen-induced increase in bronchial responsiveness to histamine: relationship to the late asthmatic response and change in airway caliber. *J Allergy Clin Immunol* 1982; 70: 170-177.
178. Joseph LK, Gregg I, Mulle AM, Holgate. Nonspecific bronchial reactivity and its relationship to the clinical expression of asthma. *Am Rev respir Dis* 1989; 140: 350-357.
179. Hargreave FE, Ramsdale EH, Pugsley SO. Occupational asthma without bronchial hyperresponsiveness. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 513-515.
180. Stanescu DC, Frans A. Bronchial asthma without increase airway reactivity. *Am Rev Respir Dis* 1982; 63: 5-12.
181. Venge P, Hakansson L, Peterson CGB. Eosinophil activation in allergic diseases. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82: 333-337.
182. Virchow J-C Jr, Kroegel C, Hage U, Korstsik C, Matthys H, Werner P. Comparison of sputum-ECP levels in bronchial asthma and chronic bronchitis. *Allergy* 1993; 48: 112-118.
183. Pipkorn U. Mediators and nasal allergy. *Clin Exp Allergy* 1989; 19: 585-589.
184. Bradley BL, Azzawi M, Jacobson M, et al. Eosinophils, T lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 88: 661-674.



185. Tomassini M, Magrini L, De Petrillo G, Adriani E, Bonini S. Serum levels of eosinophil cationic protein and allergen exposure (Abs). *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91: 1(2): 180.
186. Juliusson S, Pipkorn U, Karlsson G, Enerbäck L. Mast cells and eosinophils in the allergic mucosal response to allergen challenge: changes in distribution and signs of activation in relation to symptoms. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 989-909.
187. Schmekel B, Venge P. Markers for eosinophils and T-lymphocytes as predictors of late asthmatic response. *Allergy* 1993; 48: 94-97.
188. Hed J, Hallden G. Counts of activated blood eosinophils for monitoring asthma. *Allergy* 1993; 48: 87-93.
189. Dahl R. Monitoring bronchial asthma in the blood. *Allergy* 1988; 48: 77-80.
190. Quanjer PH. Standardized lung function testing. *Bull Eur Physiopath Respir* 1983; 19: 7-28.
191. American Thoracic Society. Standardization of spirometry 1987 update. *Am Rev Respir Dis* 1987; 130: 1296-1299.
192. Lebowitz MJ. The use of peak expiratory flow rate measurements in respiratory diseases. *Ped Pneumol* 1991; 11: 166-174.
193. Ryan G, Latimer KM, Dolovich J, Hargreave FE. Bronchial responsiveness to histamine: relationship to diurnal variation of peak flow rate, improvement after bronchodilator therapy. *Thorax* 1982; 37: 423-429.